

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Farmacología**



**TESIS DOCTORAL**

**Papel de los esfingolípidos en las alteraciones vasculares asociadas al  
daño pulmonar agudo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Rachele Pandolfi**

Directores

**Francisco Pérez Vizcaíno  
Laura Moreno Gutiérrez**

**Madrid, 2016**

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Medicina  
Programa de Doctorado en Investigación Biomédica  
Departamento de Farmacología



***Papel de los esfingolípidos  
en las alteraciones vasculares asociadas  
al daño pulmonar agudo***

**Rachele Pandolfi**

Directores de la Tesis Doctoral:  
**Dr. Francisco Pérez Vizcaíno y Dra. Laura Moreno Gutiérrez**

Madrid, 2015





D. FRANCISCO PÉREZ VIZCAÍNO, Vicedecano de Investigación y Política Científica y Profesor titular de la Universidad Complutense de Madrid y

Dña. LAURA MORENO GUTIÉRREZ, Investigadora contratada Miguel Servet del CIBER de Enfermedades Respiratorias,

CERTIFICAN:

Que Dña. RACHELE PANDOLFI, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado **“Papel de los esfingolípidos en las alteraciones vasculares asociadas al daño pulmonar agudo”** para alcanzar el Grado de Doctor, el cual reúne los requisitos de originalidad y contenido exigidos, por lo que autorizan su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden el presente certificado en Madrid, a 3 de Junio de 2015.

Fdo. Francisco Pérez Vizcaíno

Fdo. Laura Moreno Gutiérrez



*Ai miei genitori,  
per aver creduto in me e per avermi sempre appoggiato in qualsiasi occasione.  
Se sono arrivata fin qui, lo devo soprattutto a voi e alla dolcezza e premura  
che mi avete dimostrato giorno per giorno.  
Siete la mia vita,  
vi voglio bene.*

*A Quique,  
por haber tenido mucha paciencia y por entender la necesidad de dedicar horas  
al trabajo y a la escritura de esta Tesis.  
Gracias por tu cariño y tu apoyo en todos estos años,  
me han ayudado a llegar hasta aquí.*

*A tutto il resto della mia famiglia,  
che nonostante la distanza, é come se fosse stata sempre qui al mio fianco.  
Vi adoro,  
senza di voi non sarebbe lo stesso.*



## **AGRADECIMIENTOS/RINGRAZIAMENTI**

Ha llegado el momento de agradecer a todos aquellos que en estos años se han cruzado en mi camino y me han dado la posibilidad de conseguir mi doctorado.

Espero ser capaz de expresar mis sentimientos hacia las personas que me han apoyado y fortalecido durante mi “aventura madrileña”.

Con vuestro permiso, os dejo unas líneas en italiano también, para que todos puedan entender lo que quiero decir.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de Tesis, el Profesor Francisco Pérez Vizcaíno y la doctora Laura Moreno Gutiérrez.

Al Profesor Francisco Pérez Vizcaíno, por haberme permitido trabajar en su laboratorio y por enseñarme con pasión todo lo que es ciencia. No solo como investigador, sino también como persona es digna de respeto y admiración. Paco, eres un buen jefe y contigo he aprendido mucho. Muchas gracias de corazón por todo.

A la Doctora Laura Moreno Gutiérrez, por haber confiado en mí y por haberme explicado con paciencia todo lo que sabe. Aunque la ciencia tiene momentos buenos y malos, cada vez ha estado a mi lado, como jefa y como amiga. Si he podido crecer profesionalmente y llegar hasta aquí, es también gracias a ella. Laura, eres una grande.

Al Profesor Ángel Cogolludo, por ayudarme cuando lo he necesitado y por preocuparse por mí. Su alegría y su capacidad de ser a la vez jefe y compañero, me han permitido trabajar más a gusto y estimarlo cada día más. Gracias a él he compartido momentos buenos tanto dentro como fuera del trabajo. Ángel, “grazie mille”.

A todo el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina (UCM), a la directora Maribel Colado y a las personas que lo componen por haberme permitido desarrollar el programa doctoral y, a todos los estudiantes de doctorado de la facultad por haber compartido conmigo estos tres años.

Este proyecto es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo de trabajo. Por esta razón agradezco a Daniel, por haberme transmitido sus conocimientos y por haber compartido conmigo los momentos buenos y los malos, siendo un buen compañero y un buen amigo. A Bianca, por preocuparse por mí, por ayudarme en cada momento y por estar siempre ahí. Gracias a ella, he aprendido un montón y he encontrado una buena amiga. A Andrea, por preocuparse por mí y por ayudarme con paciencia con la informática y la gramática española y por alegrarme el día con sus delicias culinarias. A Virginia, por la buena persona que es, por su alegría y su sonrisa que han animado nuestras innumerables horas de trabajo. Aunque ahora ella no esté en el laboratorio, es como si estuvieras todavía ahí con sus expresiones graciosas (“¿é o no é?”). A Maga, que aunque hace poco que nos conocemos, en seguida se ha integrado en el grupo y será una pena verla marchar.

Trabajar con compañeros, a la vez amigos, ha sido un placer. Las horas transcurridas en el laboratorio son muchas, pero al saber de poder contar con la ayuda de cada uno ha transformado mi experiencia profesional en el extranjero, en un buen recuerdo que siempre



llevaré conmigo. Estar lejos de casa es una prueba dura, pero gracias al cariño y la manera de ser de mis compañeros y de mis jefes, ha sido posible.

A todos los otros compañeros que, aunque por un breve periodo de tiempo, he tenido el placer de conocer como Javier, Enrique, Belén, Carmen, Giulia, Noelia y Camila. Cada uno a su manera, me ha dejado un buen recuerdo del tiempo transcurrido juntos. Agradezco también a Iván, Alejandro, Alberto, Pilar, Fernando, Marta, Belén, Raquel, Marisa, Fernando por los buenos ratos compartido juntos, dentro y fuera de la Universidad.

Mis agradecimientos van también al Dr José Angel Lorente, a la Dra. Raquel Herrero Hernández, al Dr. Andrés Esteban y al Dr. Miguel Ángel de la Cal, por haber hecho posible mi estancia en el laboratorio de Investigación de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario de Getafe y por haberme dejado participar activamente en los estudios de investigación del grupo. Doy las gracias a los componentes del grupo como Antonio Ferruelo, Lucía Prados, Tamara Fernández Delgado, Antonio Garofalo y Mariam El Assar de la fuente y todos los otros trabajadores del Instituto por acogerme como una compañera de trabajo.

A la Dra. Beatriz Olaiz Navarro y al Dr. Julio Cortijo del servicio de cirugía cardiotorácica del Hospital Universitario de Getafe y del Hospital Universitario de Valencia, respectivamente, por proporcionarnos resecciones o biopsias pulmonares humanas.

A la Unidad de Genómica de la Facultad de Ciencias Biológicas (UCM), a la Unidad de Microbiología (Dr. Luis Alou, Dr. Fabio Cafini Barrado) y de Bioquímica (Dra. Ines Hernandez Fisac) de la Facultad de Medicina (UCM), al Dr. Felipe Llanes de la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid por contribuir con sus servicios a la realización de esta Tesis.

A todos mis ex compañeros del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) donde empecé mi trabajo en la investigación y mi primera experiencia en el extranjero. Quiero agradecer a Mar Valés Gómez por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y a todas mis compañeras, Sheila, Miriam, Eva, Gema, Lola, Gloria y Daniela por haber compartido buenos ratos juntas. Aunque no trabajemos todavía en el mismo lugar, sé que puedo confiar en ellas. Me alegro haberlas conocido y poder seguir cultivando nuestra amistad. Un gracias va también a todos los nuevos amigos que he tenido el placer de conocer durante mi experiencia en el CNB, cuales Carla (mi querida amiga italiana y compañera de Leonardo), Pedro, Araceli, Javier, Dimitri, Jesus, Jorge, Amaia, Gonzalo, Maria, Vicen, Lorena y muchos más que rellenarían la página entera. Gracias a todos de verdad.

A Fernando, Beatriz y toda la familia Mostaza/Escribano por darme cariño, por preocuparse por mí y por acogerme como una más de la familia.

A todas mis nuevas amistades conocidas aquí en Madrid. Empiezo dando las gracias a “mis amigos internacionales”, que son Claire, Laini, Aurore, Miguel, Anabela, Daniela y Erik por haberme enseñado como disfrutar de una ciudad maravillosa como Madrid. Muchas gracias también a los amigos burgaleses que desde el principio me han tratado como una del grupo.



A todos los amigos italianos que he encontrado durante mi estancia en España y que me han animado cuando echaba de menos mi Italia. Entre ellos, Elena, Valerio, Gabriele, Giovanna, Claudio, Enrico, Sara, Antonio, Ginevra.

Al Ministerio de Economía y Competitividad, a la asociación “European Commission Marie Curie Actions”, a la Fundación Mutua Madrileña y al CIBERES (Centros de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Respiratorias) que me concedieron contratos o becas predoctorales para realizar esta Tesis Doctoral.

Un grande ringraziamento va al mio fidanzato, ai miei genitori, zii, cugini e familiari, che mi sono stati vicini e che hanno sempre creduto in me. Un grazie speciale va alla mia cuginetta Ginevra, alla quale, purtroppo non ho potuto dedicare molto tempo durante questi anni, ma che é sempre nei miei pensieri. Famiglia mia, siete unici.

Un grazie speciale va alla mia amica Chiara. Anche se la distanza ci separa, é riuscita sempre a starmi vicina ed appoggiarmi nei momenti più difficili. Durante questi anni, non abbiamo potuto farci le nostre solite chiaccherate notturne nella “vecchia cucina pisana”, come ai tempi universitari, però ogni volta che sono ritornata in Italia, é come se non ci fossimo mai separate. Chiaretta mia, dedico anche a te la mia tesi. Rimani sempre come sei.

Desidero ringraziare anche Laura, per avermi sopportato durante tutta la stesura della tesi e per aver accettato i miei silenzi dopo una brutta giornata di lavoro. Anche se é difficile vivere sotto lo stesso tetto e se a volte la routine quotidiana non aiuta, siamo riuscite a trovare il giusto equilibrio ed a trasformare la nostra convivenza in una bella amicizia. Ovunque andremo a finire, sono sicura che non ci perderemo di vista e potremo contare sempre l’una per l’altra.

Un grazie va anche ad Ambretta, la mia cara amica romana, che da brava turista che é, ha colto l’occasione per venirmi a trovare nella grande metropoli madrileña. Sempre é stata presente nei momenti importanti o “di transizione” ed eccola qui ancora una volta. Ambry, sei una grande amica.

I miei ringraziamenti vanno anche a tutti gli amici che ho lasciato in Italia e che mi hanno dedicato parte del loro tempo, anche se solo qualche ora, al mio ritorno a casa. Tra questi voglio ricordare Verdiana e Federica, le mie care amiche, sempre pronte ad aiutarmi. Voglio ringraziare anche Ambra, Ilaria, Valeria, Irene, Jacopo, Gioia, Antonietta, Maria, Speranza e i miei compagni universitari Ilaria, Linda, Serena e Marco. Grazie di cuore a tutti per preoccuparvi per me e per volermi bene.

¡Gracias a todos! Grazie a tutti!

## ÍNDICE



<b>ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>RESUMEN</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	21
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	29
<b>1. DAÑO PULMONAR AGUDO (DPA) Y SÍNDROME DE DISTRÉS RESPIRATORIO (SDRA)</b> .....	31
1.1. Definición.....	31
1.2. Epidemiología.....	32
1.3. Fisiología del DPA.....	34
1.3.1. Inflamación y coagulación	
1.3.2. Alteraciones de la circulación pulmonar	
1.3.3. Permeabilidad vascular pulmonar y edema	
1.3.4. Resolución y fibroproliferación	
1.4. Biomarcadores de DPA.....	51
1.5. Tratamientos.....	54
1.6. Modelos animales de DPA.....	61
1.6.1. Modelo de DPA inducido por lipopolisacárido (LPS)	
1.6.2. Modelo de DPA inducido por ventilación mecánica (VILI)	
1.6.3. Modelo de shock hemorrágico y traumático	
<b>2. ESFINGOLÍPIDOS</b> .....	68
2.1. Estructura y función.....	68
2.2. Metabolismo.....	69
2.3. Compartimentalización y regulación de los esfingolípidos bioactivos....	71
2.4. Microdominios de membrana.....	72
2.5. Esfingolípidos y vías de señalización.....	74
2.5.1. Las esfingomielinasas	
2.5.1.1. La esfingomielinasa ácida (aSMasa)	
2.5.1.2. La esfingomielinasa neutra (nSMasa)	
2.5.2. Ceramida y ceramida-1-fosfato (C1P)	
2.5.3. Esfingosina y esfingosina-1-fosfato (S1P)	
2.6. Papel fisiopatológico de los esfingolípidos a nivel pulmonar.....	85
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	91

<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>95</b>
<b>1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....</b>	<b>97</b>
1.1. Modelo de instilación intratraqueal de lipopolisacarido.....	97
1.2. Modelo de shock hemorrágico y traumático.....	98
1.3. Modelos <i>in vitro</i> .....	100
<b>2. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR (MTT).....</b>	<b>102</b>
<b>3. MEDIDA DE LOS NIVELES DE INTERLEUQUINAS Y INMUNOGLOBULINA M (ELISA).....</b>	<b>103</b>
<b>4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRITO (GRIESS).....</b>	<b>104</b>
<b>5. REGISTRO DE CONTRACTILIDAD EN ARTERIAS PULMONARES AISLADAS DE RATA Y HUMANAS.....</b>	<b>105</b>
5.1. Descripción de la técnica empleada. Registro de contractilidad en AP de resistencia.....	105
5.2. Protocolo experimental.....	105
5.2.1. Efectos del LPS, de la SMasa, del D609 y de la IL-6 en AP de resistencia incubadas	
5.2.2. Efectos de la IL-6 en agudo en AP de resistencia de rata en fresco	
<b>6. INMUNOCITOQUÍMICA.....</b>	<b>107</b>
6.1. Aislamiento y tratamiento de células de músculo liso.....	107
6.2. Cuantificación de ceramida mediante inmunocitoquímica.....	108
<b>7. SILENCIAMIENTO.....</b>	<b>108</b>
<b>8. MEDIDA DE PROTEÍNAS (MÉTODO LOWRY).....</b>	<b>110</b>
<b>9. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA (MPO).....</b>	<b>111</b>
<b>10. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA ESFINGOMIELINASA ÁCIDA (aSMasa).....</b>	<b>111</b>
<b>11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....</b>	<b>112</b>
<b>12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.....</b>	<b>113</b>
<b>13. HISTOLOGÍA.....</b>	<b>115</b>
<b>14. REACTIVOS.....</b>	<b>115</b>
<b>15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>116</b>

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>117</b>
<b>1. PAPEL DE LA ESFINGOMIELINASA ÁCIDA Y DE LA IL-6 EN EL MODELO DE DPA INDUCIDO POR LPS.....</b>	<b>119</b>
1.1. Efectos del LPS y de la SMasa exógena sobre la producción de ceramida, IL-6 y nitrito <i>in vitro</i> .....	119
1.1.1. Regulación de la producción de la producción de IL-6 en células de músculo liso vascular de arteria pulmonar de rata	
1.1.2. Efectos del silenciamiento de la esfingomielinasa ácida en células de músculo liso vascular de arteria pulmonar de rata	
1.1.3. Variación de la producción de nitrito en anillos de arterias pulmonares de rata	
1.2. Efectos del LPS, de la SMasa exógena y de la IL-6 sobre la contractilidad y la disfunción endotelial en arterias pulmonares de resistencia de rata.....	126
1.2.1. Caracterización de la respuesta contráctil	
1.2.1.1. Respuesta a KCl e hipoxia	
1.2.1.2. Respuesta a serotonina	
1.2.1.3. Respuesta a fenilefrina	
1.2.2. Caracterización de la función endotelial: respuesta a acetilcolina	
1.2.3. Dependencia de dosis en los efectos de D609 sobre la contractilidad y la disfunción endotelial en arterias pulmonares de resistencia de rata	
1.3. Efectos del LPS y del D609 sobre la contractilidad y la disfunción endotelial en arterias pulmonares de resistencia humanas.....	132
1.4. Modelo animal de DPA inducido por instilación intratraqueal de LPS en rata.....	134
1.4.1. Respuesta inflamatoria pulmonar y marcadores de permeabilidad vascular	
1.4.2. Análisis histológico	
1.5. Determinación de la presión arterial pulmonar.....	138
<b>2. EFECTOS DE LA ESFINGOMIELINASA ÁCIDA Y QUERCETINA EN EL MODELO DE SHOCK HEMORRÁGICO Y TRAUMÁTICO.....</b>	<b>140</b>
2.1. Mortalidad.....	140



2.2. Presión arterial y frecuencia cardíaca.....	141
2.3. Electrolitos, hematocrito y hemoglobina.....	143
2.4. Gasometrías.....	144
2.5. Marcadores de inflamación y permeabilidad vascular pulmonar.....	147
2.6. Análisis histológico.....	149
2.7. Translocación bacteriana.....	151
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>153</b>
<b>1. MODELO DE DPA INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)..</b>	<b>155</b>
1.1. Papel de la vía SMasa-ceramida en la respuesta inflamatoria vascular inducida por endotoxina <i>in vitro</i> .....	155
1.2. Relación entre la vía de iNOS y aSMasa.....	159
1.3. Papel de la aSMasa y la IL-6 en el desarrollo de disfunción vascular pulmonar inducida por endotoxina <i>in vitro</i> .....	160
1.4. Efectos de la inhibición de la aSMasa en el modelo de DPA inducido por LPS <i>in vivo</i> .....	164
<b>2. MODELO DE SHOCK HEMORRÁGICO TRAUMÁTICO.....</b>	<b>167</b>
2.1. Cambios hemodinámicos.....	167
2.2. Alteraciones de electrolitos, hematocrito y hemoglobina.....	171
2.3. Inflamación y permeabilidad vascular.....	173
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>177</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>181</b>

## **ABREVIATURAS**



- **5-HT**, serotonina
- **ACh**, acetilcolina
- **AECC**, conferencia de consenso americano-europeo
- **AMPc**, adenosín monofosfato cíclico
- **Ang-1/2**, angiopoietina-1/2
- **AP**, arteria pulmonar
- **ARNi**, ARN de interferencia
- **ARNm**, ácido ribonucleico mensajero
- **aSMasa**, esfingomielinasa ácida
- **Asn**, asparagina
- **BMP**, bis-monoacilglicerofosfato
- **BNM**, bloqueantes neuromusculares
- **BSA**, albúmina de suero
- **C1P**, ceramida-1-P
- **Ca<sup>2+</sup>**, catión calcio
- **CCSP**, proteína secretada por la células de Clara
- **CDasas**, ceramidasa
- **Cer**, ceramida
- **CERK**, ceramida quinasa
- **CERT**, proteína transportadora de ceramida
- **cIAP2**, inhibidor 2 de la apoptosis celular
- **CMLV**, células de músculo liso vascular
- **CMLVAP**, CMLV de arteria pulmonar
- **cPLA2**, fosfolipasa A2 citosólica
- **cPLA2- $\alpha$** , cPLA2 alfa
- **CRP**, proteína C reactiva
- **Cx**, conexina
- **DAG**, 1,2- diacilglicerol
- **DAMPs**, patrones moleculares asociados a daño
- **DBP**, displasia broncopulmonar
- **dhCer**, dihidroceramida
- **DPA**, daño pulmonar agudo
- **E.e.m**, error estándar de la media
- **ECE**, enzima de conversión de la ET-1
- **ECMO**, oxigenación con membrana extracorpórea
- **EMT**, transición epitelio-mesenquimal
- **eNOS**, óxido nítrico sintasa endotelial
- **EPOC**, enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- **ERN**, especies reactivas del nitrógeno
- **ERO**, especies reactivas del oxígeno
- **ET-1**, endotelina 1
- **FADD**, proteína con dominio de muerte asociada a Fas
- **FAPP2**, proteína adaptadora de cuatro fosfato 2
- **FiO<sub>2</sub>**, concentración fraccional de oxígeno en el aire inspirado
- **GCs**, glucocorticoides
- **GlcCer**, glucosilceramida
- **GM-CSF**, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

- **GMPC**, guanosín monofosfato cíclico
- **GSLs**, glicosfingolípidos
- **Hb**, hemoglobina
- **HGF**, factor de crecimiento de los hepatocitos
- **HMGB1**, proteína nuclear del grupo de alta movilidad B1
- **HP**, hipertensión pulmonar,
- **HR**, frecuencia cardíaca
- **ICAM-1**, molécula de adhesión intercelular 1
- **IFN- $\gamma$** , interferón  $\gamma$
- **IL1**, interleuquina 1
- **IL-1ra**, antagonista del receptor IL-1
- **IL-1 $\beta$** , interleuquina 1 beta
- **IL-6**, interleuquina 6
- **IL-8**, interleuquina 8
- **iNOS**, óxido nítrico sintasa inducible
- **IRF1**, factor 1 regulador del interferón
- **IT**, intratraqueal
- **JAMs**, moléculas de adhesión de unión
- **K<sup>+</sup>**, catión potasio
- **KGF**, factor de crecimiento de queratinocitos
- **KL-6**, proteína krebs von den Lungen 6
- **LBA**, lavado broncoalveolar
- **LBP**, proteína de unión al lipopolisacárido
- **LPS**, lipopolisacárido
- **MCLK**, quinasas de las cadenas ligeras de miosina
- **MEC**, matriz extracelular
- **Mg<sup>2+</sup>**, catión magnesio
- **MIPs**, macrófagos intravasculares pulmonares
- **Mn<sup>2+</sup>**, catión manganeso
- **MPO**, mieloperoxidasa
- **MSCs**, células madre mesenquimales
- **Na<sup>+</sup>**, catión sodio
- **NETs**, trampas extracelulares de neutrófilos
- **NLRs**, receptores tipo “NOD”
- **nmMLCK**, quinasa de la cadena ligera de miosina no-muscular
- **NO**, óxido nítrico
- **N-PCP-III**, péptido del procolágeno aminoterminal de tipo III
- **nSMase**, esfingomielinasa neutra
- **PAF**, el factor de activación plaquetaria
- **PAI-1**, inhibidor 1 del activador del plasminógeno
- **PAM**, presión arterial media
- **PAMPs**, patrones moleculares asociados a patógenos
- **PaO<sub>2</sub>**, presión parcial del oxígeno
- **PAP**, presión arterial pulmonar
- **PDE**, fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos
- **PECAM-1**, molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1
- **PEEP**, presión positiva al final de la espiración

- **PGI<sub>2</sub>**, prostaciclina
- **Phe**, fenilefrina
- **PI**, fosfatidilinositol
- **PKC  $\delta$** , proteína quinasa C  $\delta$
- **PKC $\zeta$** , PKC  $\zeta$
- **PKG**, proteína quinasa dependiente de GMPc
- **PLA<sub>2</sub>**, fosfolipasa A<sub>2</sub>
- **PLC**, fosfolipasa C
- **PMN**, polimorfonucleares
- **RVP**, resistencia vascular pulmonar
- **RAGE**, receptores de los productos finales de glicación avanzada
- **RE**, retículo endoplasmático
- **RLRs**, receptores tipo “RIG-I”
- **S1P**, esfingosina-1-fosfato
- **SDRA**, síndrome de distrés respiratorio agudo
- **sICAM-1**, forma soluble de la molécula de adhesión intercelular 1
- **SM**, esfingomielina
- **SMasas**, esfingomielinasas
- **SP-D**, proteínas del surfactante pulmonar tipo D
- **Sph**, esfingosina
- **SphK1, 2**, Sph quinasas 1, 2
- **SPT**, serina palmitoil transferasa
- **SS**, solución salina
- **sTNF-RI/II**, el receptor I/II de TNF soluble
- **TGF- $\beta$ 1**, el factor de crecimiento transformante beta 1
- **TGN**, trans-golgi network
- **TLRs**, receptores tipo “Toll”
- **TNF- $\alpha$** , factor de necrosis tumoral alfa
- **tPA**, activador del plasminógeno tisular
- **TRAF2**, factor 2 asociado al receptor del TNF
- **TXA<sub>2</sub>**, tromboxano A<sub>2</sub>
- **UCI**, unidad de cuidados intensivos
- **V/Q**, ventilación-perfusión
- **VCAM-1**, molécula de adhesión vascular 1
- **VEGF**, factor de crecimiento endotelial vascular
- **VILI**, daño inducido por ventilación mecánica
- **VPH**, vasoconstricción pulmonar hipóxica
- **Vt**, volúmenes corrientes
- **vWF**, factor de von Willebrand
- **Zn**, zinc



## **RESUMEN**





El síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) se caracteriza por edema pulmonar y colapso alveolar que conduce a hipoxemia arterial grave. Las causas más frecuentes de SDRA son la sepsis y los traumatismos. Aunque las estrategias protectoras de soporte ventilatorio y hemodinámico han permitido mejorar el pronóstico, la mortalidad asociada se mantiene intolerablemente elevada por lo que el descubrimiento de nuevos tratamientos efectivos tendría un gran impacto en la supervivencia de los pacientes. Además, la existencia de disfunción vascular pulmonar es un factor independiente asociado a un peor pronóstico en estos pacientes.

Los esfingolípidos son componentes estructurales de las membranas, que regulan la dinámica de éstas y forman parte de los microdominios de membrana denominados balsas lipídicas de membrana (*"lipid rafts"*). Los esfingolípidos actúan también como segundos mensajeros intracelulares implicados en la regulación de procesos celulares clave como la diferenciación, el crecimiento, la apoptosis o la inmunidad innata y adquirida. Estudios previos sugieren que la ceramida producida por la esfingomielinasa (SMasa) neutra (nSMasa) está implicada en la regulación del tono vascular pulmonar. Además, la esfingomielinasa ácida (aSMasa) se encuentra elevada en pacientes en estado crítico. Las evidencias acumuladas durante los últimos años sugieren que los esfingolípidos podrían desempeñar un papel en el SDRA. La imipramina o su análogo desipramina y el D609 son compuestos no relacionados químicamente que tienen en común su capacidad de inhibir la esfingomielinasa ácida.

La quercetina y otros flavonoides relacionados son compuestos presentes en frutas y verduras. Se ha propuesto que a través de sus acciones antioxidantes, antiinflamatorias y a su capacidad para modular un gran número de enzimas y receptores, su consumo puede reducir el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes o enfermedades neurodegenerativas. Estudios recientes sugieren que la quercetina, probablemente a través de la inhibición de la liberación de las proteínas nucleares del grupo 1 de alta movilidad (high-mobility group box 1; HMGB1), atenúa la inflamación sistémica y reduce la mortalidad en un modelo de endotoxemia en rata.

### **Hipótesis y objetivos**

La **hipótesis general** que nos planteamos en esta Tesis Doctoral es que la mortalidad y la respuesta inflamatoria vascular pulmonar asociadas al daño pulmonar agudo inducido

por endotoxina o por traumatismo y hemorragia se pueden prevenir mediante inhibidores de la aSMasa y/o quercetina.

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es, por lo tanto, la caracterización del papel de la aSMasa en daño pulmonar agudo y la identificación de posibles estrategias farmacológicas.

### **Material y métodos**

Se ha utilizado un modelo de exposición *in vitro* a endotoxina con anillos de arteria pulmonar (AP) y cultivos primarios de células del músculo liso vascular (CMLVAP) de rata. Las células o los anillos arteriales se incubaron durante 24 horas en medio DMEM en ausencia (control) o presencia de LPS, SMasa bacteriana (*Bacillus cereus*) o IL-6. En algunos experimentos, las células se incubaron 30-60 minutos antes de la adición del estímulo en presencia o ausencia de diferentes fármacos moduladores de la respuesta inflamatoria (el glucocorticoide dexametasona, el inhibidor de TAK-1 5z-7-oxozeaenol, el inhibidor de iNOS 1400W, el inhibidor del receptor TLR4 TAK-242 o el antagonista de los receptores de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> sarpogrelato) y del metabolismo de esfingolípidos (los inhibidores de aSMasa desipramina y D609). 24 horas después del tratamiento se analizó la reactividad vascular (mediante el uso de miógrafos isométricos) y se determinaron los niveles de mediadores inflamatorios, IL-6 o nitrito, en el medio de cultivo (mediante ELISA o la reacción de Griess). Asimismo, se determinó mediante inmunocitoquímica la producción de ceramida en CMLVAP frescas extraídas mediante digestión enzimática.

El potencial terapéutico de los inhibidores de SMasa ácida (D609 e imipramina) o de la quercetina se evaluó en un modelo de SDRA inducido por la instilación intratraqueal de LPS y en un modelo de shock hemorrágico traumático en rata. En el modelo de LPS, 30 minutos antes de instilar LPS (300 µg/Kg peso) o solución salina por vía intratraqueal, se administró i.p. el vehículo (DMSO) o D609 (50 mg/Kg de peso corporal) y se realizaron las determinaciones y se tomaron muestras después de 4 h. El protocolo del modelo de shock traumático y hemorrágico incluyó laparotomía durante 15 minutos (trauma), shock hemorrágico (extracción sanguínea hasta una presión arterial media de 35 mmHg) durante 75 minutos y la resucitación mediante la re-infusión de la sangre extraída más Ringer lactato durante 90 min. Los fármacos (D609 20 mg/kg, imipramina

1 mg/kg o quercetina 50 mg/kg) y el vehículo (DMSO) se administraron por vía intravenosa durante la resucitación.

## **Resultados**

El LPS indujo la activación de la aSMasa en CMLVAP. La inhibición de esta enzima por D609 o desipramina o el silenciamiento de la expresión del gen que codifica la enzima (SMPD1) previno la producción de IL-6 en las CMLVAP. Este efecto se previno también por TAK-242, glucocorticoides, 5z-7-oxozeaenol y sarpogrelato, pero fue independiente de iNOS. La SMasa exógena reprodujo los efectos del LPS y su efecto se previno con los mismos inhibidores (con la excepción del TAK-242).

El LPS redujo la capacidad de los vasos para contraer en respuesta a KCl o fenilefrina e inhibió la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH), potenció la vasoconstricción pulmonar inducida por la serotonina y redujo la relajación dependiente de endotelio inducida por la acetilcolina (ACh). Además, el tratamiento con SMasa exógena o IL-6 reprodujo los efectos inducidos por el LPS sobre la VPH, la función endotelial y la vasoconstricción pulmonar inducida por serotonina, a pesar de no modificar las respuestas contráctiles inducidas por KCl o fenilefrina. La incubación de las AP de rata con dexametasona y 1400W previno la hiporrespuesta a KCl y a hipoxia, mientras que el 5z-7-oxozeaenol no fue capaz de prevenir estas alteraciones. Por el contrario, el D609 produjo una hiperrespuesta a hipoxia en las AP de rata y humanas. Aunque la SMasa exógena y la IL-6 no modificaron la capacidad de los vasos aislados para contraer a KCl, estos dos factores inhibieron significativamente la vasoconstricción hipóxica. El LPS indujo una hiperrespuesta a serotonina que fue parcialmente sensible a dexametasona, insensible a 1400W y que se previno por el 5z-7-oxozeaenol y el D609. La IL-6 y la SMasa exógena indujeron un aumento en la contracción en respuesta a 5-HT. El LPS produjo también una hiporrespuesta a fenilefrina que se revertió completamente por la dexametasona y el 1400W. Ni la IL-6 ni la SMasa exógena afectaron de forma significativa la contracción a fenilefrina. El LPS, la SMasa y la exposición aguda a IL-6 indujeron disfunción endotelial en los anillos de AP de rata, que se previno por el inhibidor de la aSMasa D609, por el inhibidor de iNOS 1400W y por el glucocorticoide dexametasona, pero no por el inhibidor de TAK-1 5z-7-oxozeaenol. En las arterias pulmonares humanas el LPS también disminuyó la respuesta a ACh y el D609 revirtió este efecto.

La instilación intratraqueal de LPS estimuló la actividad aSMasa pulmonar, aumentó la presencia de marcadores de inflamación e indujo un aumento de la presión arterial pulmonar (PAP). La inhibición de la aSMasa con D609 (administración i.p. 50 mg/Kg) previno estos efectos.

En el modelo de shock hemorrágico traumático se produjo también un aumento de actividad de la aSMasa. Los tres fármacos impidieron el desarrollo de edema pulmonar, pero solo la imipramina previno significativamente el aumento de las proteínas totales en el líquido broncoalveolar (LBA) y la imipramina y el D609 previnieron el aumento de IgM en el LBA. Ninguno de los fármacos previnieron la hipoxemia y sólo parcialmente la hipotensión. La escasa presencia de marcadores inflamatorios y la ausencia de evidencias histológicas y de translocación bacteriana nos sugirió que el modelo de shock hemorrágico traumático indujo un daño pulmonar leve por lo que el efecto protector de los fármacos analizados fue parcial.

### **Conclusiones**

1. La exposición a LPS induce una activación de la aSMasa en el músculo liso vascular pulmonar, aumentando la síntesis de ceramida. La exposición a SMasa exógena reproduce muchos de los efectos del LPS incluyendo la producción de IL-6, la hiperrespuesta vascular a la 5-HT, la disfunción endotelial y la inhibición de la VPH.
2. La activación de la aSMasa por el LPS está implicada en la producción de IL-6 a través de un mecanismo sensible a glucocorticoides en el que intervienen la TAK-1 y los receptores de serotonina 5HT<sub>2A</sub>, pero independiente de iNOS.
3. La inhibición de la vasoconstricción pulmonar hipóxica y la disfunción endotelial inducida por el LPS tanto en arterias pulmonares de rata como en humanas implica la activación de la aSMasa, es sensible a glucocorticoides e inhibidores de la iNOS pero independiente de TAK-1.
4. La hiperrespuesta vascular a serotonina inducida por LPS es dependiente de la aSMasa y de TAK-1, es parcialmente sensible a glucocorticoides e independiente de iNOS. El LPS produce también una hiporrespuesta vascular a fenilefrina que no se reproduce por SMasa exógena.

5. La administración intratraqueal de LPS aumenta la actividad pulmonar de la aSMasa. Este efecto está implicado en el aumento de IL-6 en LBA, de la actividad de la mieloperoxidasa en pulmón y de la PAP. Sin embargo, el desarrollo de edema pulmonar y el aumento en la producción de IL-1 $\beta$  en LBA, son independientes de la aSMasa.
6. En el modelo de shock hemorrágico traumático se produce un aumento de la actividad de aSMasa. La quercetina y los inhibidores de la aSMasa imipramina y D609 previenen parcialmente la hipotensión, la alteración de la permeabilidad capilar pulmonar y el desarrollo de edema pulmonar, mientras que ninguno de los fármacos previene la hipoxemia.
7. En conjunto, la aSMasa es una nueva vía de señalización del LPS implicada en procesos inflamatorios y en disfunción vascular pulmonar. Los resultados de esta Tesis Doctoral sugieren que la aSMasa podría representar una posible diana terapéutica en el DPA asociado a sepsis bacteriana o shock hemorrágico traumático.



## **ABSTRACT**





The acute respiratory distress syndrome (ARDS) is characterized by pulmonary oedema and alveolar collapse leading to severe arterial hypoxemia. The most common causes of ARDS are sepsis and trauma. Although the strategies of protective mechanical ventilation and hemodynamic support have improved patient outcome, mortality remains unacceptably high, so the discovery of new effective treatments could have a major impact on patient survival. Moreover, the existence of pulmonary vascular dysfunction is independently associated with a worse prognosis in these patients.

Sphingolipids are structural components of membranes that regulate its dynamics and form membrane microdomains called *lipid rafts*. Sphingolipids also act as intracellular second messengers involved in the regulation of key processes such as cell differentiation, growth, apoptosis or innate and acquired immunity. Some evidence has accumulated in recent years regarding the possible role of sphingolipids in lung diseases, including ARDS. Previous studies suggest that ceramide produced by neutral sphingomyelinase (nSMase) is involved in the regulation of pulmonary vascular tone. In addition, acid sphingomyelinase (aSMase) is elevated in critically ill patients. Imipramine or its analogue desipramine and D609 are not chemically related compounds, which inhibit acid sphingomyelinase.

Quercetin and other related flavonoids are compounds present in fruits and vegetables. It is proposed that through its antioxidant and anti-inflammatory action and its ability to modulate a large number of enzymes and receptors, its consumption within the diet can reduce the risk of cardiovascular disease, diabetes or neurodegenerative diseases. Recent studies suggest that quercetin, probably through the inhibition of the release of high-mobility group box 1 nuclear proteins (HMGB1), attenuates the systemic inflammation and reduces mortality in a rat model of endotoxemia.

### **Hypothesis and aim**

The **general hypothesis** of this thesis is that mortality and pulmonary vascular inflammatory response associated with acute lung injury induced by endotoxin or by trauma and hemorrhage can be prevented by aSMase inhibitors and/or quercetin.

The **general aim** of this thesis is to characterize the role of aSMase in acute lung injury and to identify potential drug strategies.

## **Materials and methods**

We used a model of endotoxin exposure *in vitro* in pulmonary artery rings (PA) and primary cultures of rat pulmonary artery smooth muscle cells (rPASMCs). Cells or PA rings were incubated for 24 hours in DMEM medium in the absence (control) or presence of LPS, bacterial SMase (*Bacillus cereus*) or IL-6. In some experiments, cells were incubated 30-60 minutes before the addition of stimuli with different drugs modulating the inflammatory response (the glucocorticoid dexamethasone, the TAK-1 inhibitor 5z-7-oxozeaenol, the iNOS inhibitor 1400W, the TLR4 receptor inhibitor TAK-242 or the 5-HT<sub>2A</sub> serotonergic receptor antagonist) and the sphingolipid metabolism (the aSMase inhibitors desipramine and D609). 24 hours after treatment, vascular reactivity was analyzed (using isometric myograph) and the levels of inflammatory mediators (IL-6 or nitrite) were determined in the culture medium (by ELISA or Griess reaction). Ceramide was also quantified in fresh rPASMCs extracted with enzymatic digestion by immunocytochemistry.

The therapeutic potential of aSMase inhibitors (D609 and imipramine) or quercetin was evaluated in a rat model of ARDS induced by intratracheal instillation of LPS and in a rat model of traumatic hemorrhagic shock. In the model of LPS, 30 minutes before intratracheal instillation of LPS (300 µg/Kg body weight) or saline solution, vehicle (DMSO) or D609 (50 mg/kg body weight) were administered intraperitoneally. After 4 hours, determinations were performed and samples were collected. The protocol of traumatic hemorrhagic shock model included laparotomy for 15 minutes (trauma), hemorrhagic shock (blood withdrawal to reduce the mean arterial pressure to 35 mmHg) for 75 minutes and resuscitation by re-infusion of all the shed blood plus lactate Ringer for 90 min. The drugs (D609 20 mg/kg, imipramine 1 mg/kg or quercetin 50 mg/kg) and vehicle (DMSO) were administered intravenously during resuscitation.

## **Results**

LPS induced aSMase activation in rPASMCs. The inhibition of this enzyme, by D609, desipramine or silencing of the gene encoding the enzyme (SMPD1), prevented the production of IL-6 induced by LPS in rPASMCs. This effect was also inhibited by TAK-242, glucocorticoids, 5z-7-oxozeaenol and sarpogrelate, but was independent of

iNOS. Exogenous SMase reproduced the effects of LPS and its effect was prevented with the same inhibitors (except for TAK-242).

LPS reduced the ability of the vessels to contract in response to KCl or phenylephrine and inhibited hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV), potentiated pulmonary vasoconstriction induced by serotonin and reduced the endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (ACh). Furthermore, the treatment with exogenous SMase or IL-6 reproduced the effects induced by LPS on HPV, endothelial function and pulmonary vasoconstriction induced by serotonin, although it did not alter the contractile responses induced by KCl or phenylephrine. The incubation of rat PA with dexamethasone and 1400W prevented the hyporesponsiveness to KCl and hypoxia, whereas 5z-7-oxozeaenol was unable to inhibit these disorders. On the other hand, D609 produced hyperresponsiveness to hypoxia in rat and human PA. Although exogenous SMase and IL-6 did not modify the ability of isolated vessels to contract in response to KCl, both of them significantly inhibited the hypoxic vasoconstriction. LPS induced hyperresponsiveness to serotonin, which was partially sensitive to dexamethasone, insensitive to 1400W and it was prevented by the 5z-7-oxozeaenol and D609. IL-6 and exogenous SMase induced an increase in contraction in response to 5-HT.

LPS also produced hyporesponsiveness to phenylephrine which was completely reverted by dexamethasone and 1400W. Neither IL-6 or exogenous SMase significantly affected the contraction to phenylephrine. LPS, SMase and acute exposure to IL-6 induced endothelial dysfunction in rat PA rings, which was prevented by the aSMase inhibitor D609, the iNOS inhibitor 1400W and the glucocorticoid dexamethasone, but not by the TAK-1 inhibitor 5z-7-oxozeaenol. In human pulmonary arteries, LPS also decreased the response to ACh and D609 reverted this effect.

Intratracheal instillation of LPS augmented lung aSMase activity, increased the presence of inflammatory markers and induced an increase in pulmonary arterial pressure (PAP). The inhibition of aSMase with D609 (intraperitoneal administration, 50 mg/Kg) prevented this effect.

In the model of traumatic hemorrhagic shock, lung aSMase activity was also increased. All three drugs prevented the development of pulmonary oedema, but only imipramine significantly inhibited the increase in total protein content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and imipramine and D609 prevented the IgM increase in BALF. None of the drugs prevented hypoxemia and hypotension was only partially inhibited. The low

presence of inflammatory markers and the absence of histological evidences and bacterial translocation suggested that the model of traumatic hemorrhagic shock induced a mild lung injury, so the protective effect of the drugs tested was partial.

### **Conclusions**

1. The exposure to LPS induces aSMase activation in pulmonary vascular smooth muscle, increasing ceramide synthesis. The exposure to exogenous SMase reproduces many of the effects induced by LPS, including IL-6 production, vascular hyperresponsiveness to 5-HT, endothelial dysfunction and HPV inhibition.
2. aSMase activation by LPS is involved in IL-6 production through a mechanism sensitive to glucocorticoids in which TAK-1 and 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptors are involved, but independent of iNOS.
3. The inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction and endothelial dysfunction induced by LPS in both rat and human pulmonary arteries involves aSMase activation, it is sensitive to glucocorticoids and iNOS inhibitors, but independent of TAK-1.
4. The vascular hyperresponsiveness to serotonin induced by LPS is dependent on aSMase and TAK-1, partially sensitive to glucocorticoids and independent of iNOS. LPS also produces vascular hyporesponsiveness to phenylephrine, which is not induced by exogenous SMase.
5. Intratracheal administration of LPS increases lung aSMase activity. This effect is involved in the increase of IL-6 in BALF, mieloperoxidase activity in lung and PAP. However, the development of pulmonary oedema and the increased production of IL-1 $\beta$  in BALF are independent of aSMase.
6. In the model of traumatic hemorrhagic shock the aSMase activity is also increased. Quercetin and aSMase inhibitors imipramine and D609 partially prevent hypotension, impaired pulmonary capillary permeability and the development of pulmonary oedema, while neither of these drugs prevent hypoxemia.
7. In summary, the aSMase is a new LPS signaling pathway involved in inflammatory processes and vascular pulmonary dysfunction. The results of this thesis suggest that

aSMase could represent a potential therapeutic target in ALI associated to bacterial sepsis or traumatic hemorrhagic shock.



## **INTRODUCCIÓN**

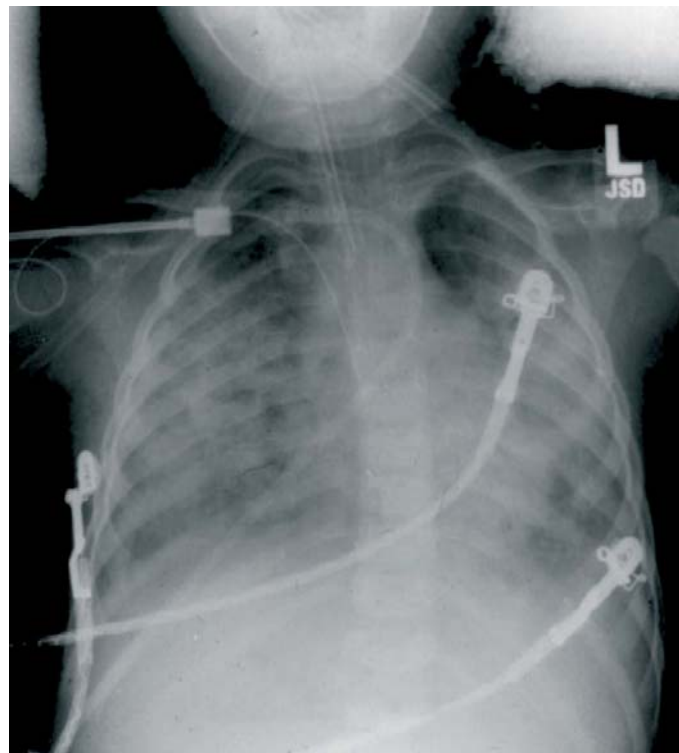




## **1. DAÑO PULMONAR AGUDO (DPA) Y SÍNDROME DE DISTRÉS RESPIRATORIO (SDRA)**

### **1.1. Definición**

El síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) y el daño pulmonar agudo (DPA) fueron descritos por primera vez en el año 1967 [Ashbaugh et al., 1967]. En la definición aprobada por la Conferencia de Consenso Americano-Europeo (AECC) del año 1994, se definen DPA y SDRA por la aparición repentina de hipoxemia con presencia de infiltrados pulmonares difusos, siendo el DPA la forma más leve. El grado de hipoxemia se determina mediante el índice de oxigenación, que es el cociente entre la presión parcial de  $O_2$  ( $PaO_2$ ) y la fracción de  $O_2$  en el aire inspirado ( $FiO_2$ ). Los infiltrados se manifiestan en la radiografía (figura 1) como edema pulmonar debido al aumento de la permeabilidad vascular pulmonar [Ashbaugh et al., 1967].



**Figura 1.** Radiografía frontal de tórax que muestra infiltrados pulmonares bilaterales consistentes en el DPA. Tomado de Wheeler AP, Bernard GR, 2007.

Recientemente se ha publicado una nueva clasificación de SDRA, conocida como la clasificación de Berlín [Force et al., 2012]. De acuerdo con la definición revisada de SDRA, se establecen tres niveles de gravedad en base al ratio  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  y considerando un nivel mínimo (5 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ) de presión positiva al final de la espiración (PEEP): 1) leve, anteriormente definido como DPA ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ ), 2) moderado ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$ ) y 3) grave ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$ ). La nueva definición de SDRA mantiene los criterios utilizados en la definición del año 1994 en lo que se refiere a la presencia de infiltrados pulmonares, el origen del edema y la hipoxemia. El término DPA, a pesar de que según las nuevas definiciones no responde a ninguna entidad clínica, se sigue empleando para identificar la fisiopatología del síndrome. Por lo tanto, la lesión pulmonar aguda se caracteriza por inflamación y aumento de la permeabilidad vascular pulmonar, produciendo edema pulmonar y colapso alveolar que conduce a hipoxemia arterial grave. La definición revisada parece haber mejorado la validez predictiva de mortalidad de su espectro de gravedad [Force et al., 2012] y presenta un método orientado a la gravedad de la enfermedad que puede ser útil para el tratamiento de SDRA [Ferguson et al., 2012].

## **1.2. Epidemiología**

Actualmente el SDRA representa una de las causas principales de insuficiencia respiratoria grave en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). La incidencia de SDRA ha sido difícil de evaluar debido a definiciones no uniformes, variaciones etiológicas y geográficas, documentación inadecuada y falta de conocimiento de la entidad. En el año 2003, utilizando la base de datos de SDRA financiada por National Institute of Health (NIH) para identificar los pacientes con SDRA de los años 1996-1999, se estimó una incidencia de 64.2 casos cada 100000 personas por año [Goss et al., 2003]. Más recientemente, Rubenfeld y cols. (2005) en un amplio estudio, utilizando como base la población residente en el condado de King (Washington), estimaron que la incidencia era de 78.9 casos cada 100000 personas por año, con una incidencia ajustada por la edad de 86.2 cada 100000 personas por año. Los puntos fuertes de este estudio fueron el uso de la definición de consenso y la inclusión de un gran número de pacientes de diferentes UCI (21 hospitales) a lo largo de un año. Extrapolando estos datos a los Estados Unidos en su conjunto, la incidencia sería de aproximadamente de 200000 pacientes con un índice de mortalidad del 40% [Rubenfeld et al., 2005]. Diferentes

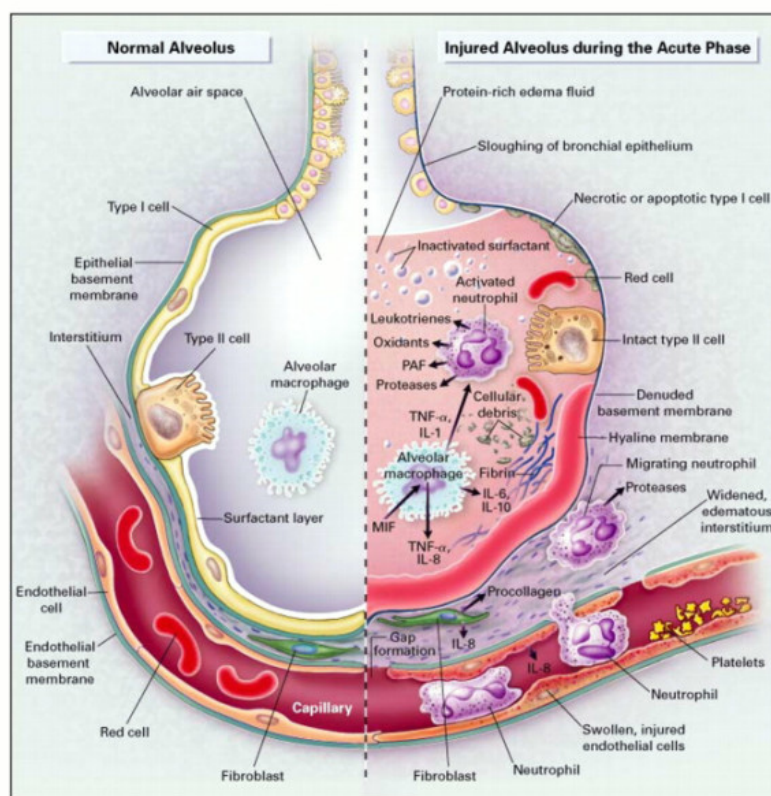
estudios han observado que la incidencia de SDRA aumenta con la edad [Hudson et al., 1995; Johnston et al., 2003; Rubenfeld et al., 2005]. De hecho, en el estudio publicado por Rubenfeld la mortalidad en los pacientes de 15-19 años se situaba en torno al 24% frente al 60% detectada en los pacientes de 85 años o más.

La lesión pulmonar puede ser causada por mecanismos directos (neumonía infecciosa, aspiración gástrica, contusión pulmonar, ahogamiento, embolismo graso, inhalación de humo o gases tóxicos, hemorragia alveolar, reperfusión) e indirectos (sepsis grave, transfusiones de sangre, shock y pancreatitis) [Ware and Matthay, 2000; Wheeler and Bernard, 2007]. La incidencia de SDRA es mayor en pacientes con sepsis grave y transfusiones múltiples, mientras que es menor en pacientes con trauma o sobredosis de drogas [Hudson and Steinberg, 1999; Rubenfeld et al., 2005]. El riesgo aumenta también en los pacientes con múltiples comorbilidades, enfermedad pulmonar crónica o que sufran de alcoholismo crónico [Ware and Matthay, 2000]. El tipo de trastorno clínico asociado es además un determinante importante de la mortalidad. Por ejemplo, la sepsis tiene una mortalidad más alta que el traumatismo (43 frente a 11%), mientras que la neumonía y la aspiración de contenidos gástricos son factores de riesgo intermedios (36 y 37%, respectivamente) [Eisner et al., 2001]. Por lo tanto, la identificación de factores de riesgo para el desarrollo de DPA/SDRA es particularmente importante en la evaluación de los tratamientos que puedan prevenir la progresión de la lesión pulmonar en poblaciones de alto riesgo.

La tasa de mortalidad de SDRA ha disminuido en las últimas dos décadas. En los años 1980, las tasas de mortalidad representaban aproximadamente el 64-70% [Fowler et al., 1983; Milberg et al., 1995; Villar and Slutsky, 1989]. Sin embargo, la comparación de estas tasas debe interpretarse con cautela, puesto que no se aprobó una definición consensuada de DPA/SDRA hasta el año 1994. Estudios más recientes indican un riesgo de mortalidad que varía entre un 29-42% [Erickson et al., 2009; Rubenfeld et al., 2005; Seeley et al., 2008; Zambon and Vincent, 2008]. Los principales factores que parecen explicar la reducción de la mortalidad son el uso de estrategias de ventilación mecánica protectoras y otras mejoras en las UCI, incluyendo el tratamiento más eficaz de la sepsis.

### 1.3. Fisiología del DPA

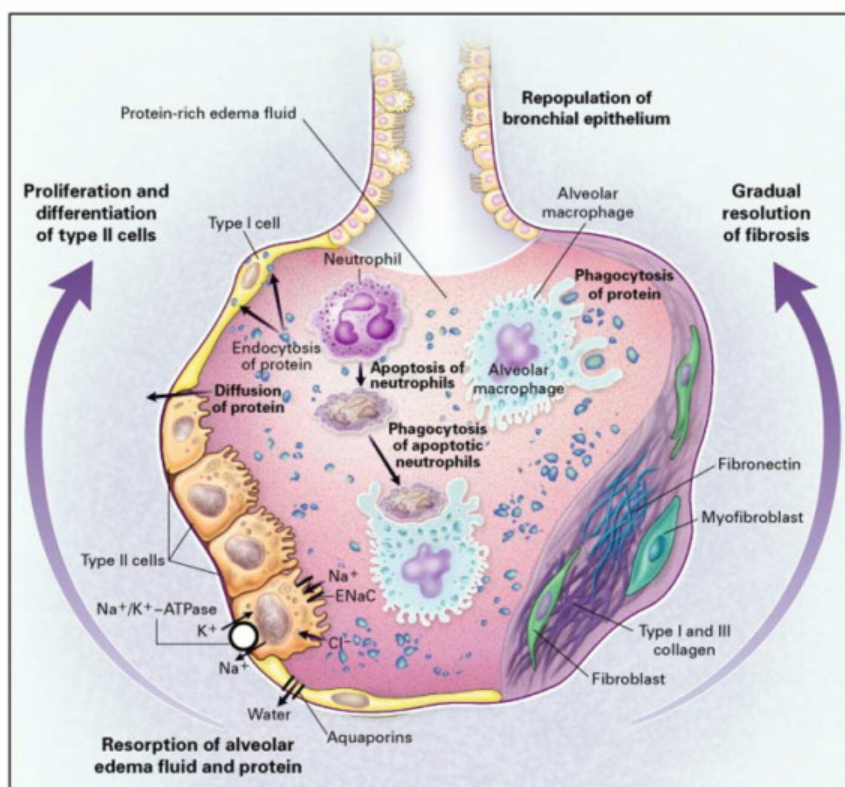
En el DPA se distinguen tres etapas patológicas diferentes (figura 2): una fase aguda llamada exudativa en la cual se presenta inflamación con infiltración leucocitaria polimorfonuclear (en particular neutrófilos) en el espacio alveolar y producción de citoquinas ( $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1; IL-8), daño alveolar-capilar y epitelial y formación de edema pulmonar; una fase fibroproliferativa con formación de membranas hialinas a nivel alveolar, proliferación celular y diversos grados de fibrosis intersticial y, por último, la fase de resolución. En algunos enfermos, el proceso proliferativo se detiene y se observa, en el curso de las siguientes semanas, una resolución rápida del cuadro. En otros, en cambio, se asiste a la instalación de una fibrosis difusa progresiva, con obliteración alveolar y destrucción o colapso de vasos pulmonares (fase crónica) [Tsushima et al., 2009; Wheeler and Bernard, 2007].



**Figura 2.** El alvéolo normal (lado izquierdo) y el alvéolo dañado (lado derecho) en la fase aguda de DPA. Tomado de Tsushima K et al., 2009.

Mediante el uso de modelos animales, se ha aprendido mucho sobre los cambios en la homeostasis endotelial y epitelial en el pulmón en las primeras 24-48 horas después de

la lesión pulmonar inicial [Ware and Matthay, 2000]. El curso clínico de DPA es variable. Algunos pacientes se recuperan en un plazo de 1-2 semanas, mientras que otros sufren un curso más extendido y requieren ventilación mecánica prolongada. La muerte por insuficiencia respiratoria primaria es relativamente poco común pero, con la prolongación del estado crítico y la ventilación mecánica, el riesgo de infección o fallo multiorgánico se incrementa, llevando a un aumento de la mortalidad. La resolución de la lesión pulmonar refleja un programa regulado activamente que implica la supresión de los neutrófilos apoptóticos, el remodelado de la matriz, la resolución del fluido alveolar rico en proteínas y la activación de numerosas vías de señalización distintas de las que participan en la lesión aguda (figura 3).



**Figura 3.** Mecanismos importantes en la resolución de DPA. Tomado de Tsushima K et al., 2009.

### 1.3.1. Inflamación y coagulación

Uno de los aspectos principales del DPA es la presencia de una respuesta inflamatoria desequilibrada que desencadena o agrava la lesión epitelial o endotelial. Esto incluye un reclutamiento no regulado de leucocitos y/o una activación exagerada de estas células,

una expresión inapropiada de citoquinas, mediadores lipídicos o especies reactivas del oxígeno (ERO), una activación incrementada de las vías de señalización mediadas por los receptores de muerte [Hogner et al., 2013; Hosakote et al., 2012; Lipke et al., 2011; Seeley et al., 2012; Vandenbroucke et al., 2008] o una actividad incontrolada de las plaquetas o de la cascada de coagulación [Matthay et al., 2012]. En general, estas respuestas son inducidas y mantenidas mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño o patógenos (DAMPs/PAMPs), a través de receptores específicos y altamente conservados como los receptores de inmunidad innata TLRs (receptores tipo “Toll”), NLRs (receptores tipo “NOD”) o RLRs (receptores tipo “RIG-I”) [Opitz et al., 2010; Wu et al., 2011a; Wu et al., 2011b].

Una respuesta inmune innata y adaptativa bien equilibrada es necesaria para eliminar la infección y evitar su propagación sistémica y, por último, para resolver los infiltrados inflamatorios, sin causar daño a la barrera alvéolo-capilar. Entre las células inmunes, los macrófagos alveolares tienen un papel importante en la inflamación. Estas células se componen de diferentes subconjuntos que residen en el pulmón o son reclutados de la circulación en presencia de un estímulo inflamatorio. Estas células son elementos clave de la respuesta inmune, forman la primera línea de defensa en la supresión del patógeno y promueven la eliminación de los restos celulares producidos por apoptosis, para permitir la resolución de la inflamación y la reparación de los tejidos [D'Alessio et al., 2012; Herold et al., 2011a; Liang et al., 2012]. En recientes estudios se ha mostrado que el exudado de macrófagos parece atenuar el daño de las células epiteliales alveolares mediante la liberación del antagonista antiinflamatorio del receptor de IL-1 (IL-1ra) en el DPA asociado con neumonía inducida por bacterias gram-negativas [Herold et al., 2011b]. Al contrario, en otros modelos de DPA, como en la neumonía viral, los macrófagos parecen contribuir a la agravación de la lesión inflamatoria mediante la expresión del ligando de muerte TRAIL o del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) [Bem et al., 2011; Hogner et al., 2013; O'Dea et al., 2011]. Por ejemplo, recientemente se ha demostrado que los precursores de los macrófagos regulan el reclutamiento de los neutrófilos y la pérdida de la función de barrera asociado con la infección bacteriana gram-negativa. Sin embargo, la disminución de los monocitos/macrófagos podría resultar en la pérdida de importantes efectos antiinflamatorios beneficiosos mediados por estas células [Dhaliwal et al., 2012; Su, 2012]. En las etapas más tardías de DPA, los macrófagos fagocitan los neutrófilos apoptóticos y las células mononucleares en

exceso [Janssen et al., 2011; Soehnlein and Lindbom, 2010]. Una deficiencia de los macrófagos alveolares residentes parece empeorar la neumonía relacionada con gripe y la lesión pulmonar en ratones, lo que lleva a un aumento de neutrófilos y sus mediadores dañinos [Narasaraju et al., 2011]. Este mecanismo refleja la amplia plasticidad funcional de los macrófagos, los cuales responden al entorno con la adquisición de diferentes fenotipos, denominados M1 (o macrófagos clásicos) y M2 (o macrófagos alternativos). Estos dos tipos de macrófagos tienen actividad opuesta: mientras que los macrófagos M1 están caracterizados por la producción de citoquinas y mediadores proinflamatorios, los macrófagos M2 se activan en ambientes ricos en mediadores antiinflamatorios, promoviendo la remodelación de la matriz y la reparación del daño, y suprimiendo la respuesta inmune [Foell et al., 2013; Herold et al., 2011a]. Por lo tanto, el estado de polarización puede representar un determinante importante para saber si los macrófagos son protectores o perjudiciales en diferentes situaciones de DPA [Nelson et al., 2012; Nguyen et al., 2012] y podría ofrecer futuras dianas terapéuticas para su tratamiento.

Otras células inmunes implicadas en el DPA son los neutrófilos, cuyo excesivo reclutamiento ha sido relacionado con daños de la barrera alveolar-capilar [Lee and Downey, 2001]. Los neutrófilos se encuentran en los capilares alveolares tanto en el DPA de origen infeccioso como no infeccioso y este proceso implica la presencia de interacciones entre quimioquinas y sus receptores [Zamjahn et al., 2011] y diferentes familias de moléculas de adhesión endotelial y epitelial, como JAMs (moléculas de adhesión de unión), ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1), PECAM-1 (molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria 1) o VCAM-1 (molécula de adhesión vascular 1), que son reguladas positivamente por mediadores inflamatorios como el TNF- $\alpha$  [Bertok et al., 2011; Herold et al., 2006; Lakshmi et al., 2012]. Una vez reclutados en el compartimento alveolar, los neutrófilos liberan proteasas o trampas extracelulares compuestas de cromatina que pueden causar daño endotelial o epitelial [Narasaraju et al., 2011; Saffarzadeh et al., 2012]. Aunque es evidente que los neutrófilos tienen un papel importante en el DPA, los pacientes pueden todavía desarrollar SDRA en condiciones neutropénicas. En estos casos la lesión pulmonar puede ser mediada por productos bacterianos como la endotoxina o por respuestas exageradas derivadas de las células inmunes residentes en el pulmón. Además de la función central de los neutrófilos en la producción de daño pulmonar, datos recientes



sugieren que estas células también pueden inducir señales de regeneración para reparar el daño que han causado en el epitelio durante la trans migración. Además, parece existir una conexión entre inflamación y coagulación. Por ejemplo, modelos de ratones transgénicos revelan que los componentes de la cascada de coagulación afectan el reclutamiento de los neutrófilos o su supervivencia, mientras que el inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) aumenta el reclutamiento de los neutrófilos después de la infección con *P. aeruginosa* y ejerce efectos antiapoptóticos sobre los neutrófilos, incrementando su carga en las vías respiratorias en un modelo de DPA inducido por LPS [Goolaerts et al., 2011; Zmijewski et al., 2011]. Además, los ratones deficientes en el activador del plasminógeno tisular (tPA) están protegidos del daño pulmonar inducido por isquemia-reperfusión, mediante la inhibición del reclutamiento de los neutrófilos [Zhao et al., 2011].

Las plaquetas son factores clave en la formación de coágulos y la homeostasis, pero recientemente se les ha atribuido un papel esencial en la defensa antibacteriana del huésped y en la fisiopatología de la sepsis y DPA. Las plaquetas expresan TLR, lo que les permite detectar PAMPs y eliminar los patógenos mediante la formación de redes o trampas extracelulares junto con neutrófilos [Jenne et al., 2013; Seeley et al., 2012]. Además, las plaquetas modulan la función de las células endoteliales y de los leucocitos durante la infección. Las interacciones de plaquetas y neutrófilos parecen ser cruciales para el reclutamiento de neutrófilos alveolares en diferentes modelos de DPA, que son en parte mediadas por quimioquinas derivadas de las plaquetas como CCL5 y CXCL4 y por selectina P [Grommes et al., 2012; Seeley et al., 2012]. Por otra parte, las plaquetas secretan metabolitos tales como IL-1 y el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) que aumentan la actividad bactericida de los neutrófilos y, a través de TLR4, facilitan la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) con las cuales inmovilizan los microbios [Caudrillier et al., 2012]. En modelos animales de DPA inducido por endotoxemia y por ácido en ratón, la activación de los neutrófilos se incrementa por la unión a las plaquetas con la consiguiente formación de complejos de plaquetas-neutrófilos y liberación del TXA<sub>2</sub>, que induce un aumento de la permeabilidad celular [Zarbock et al., 2006].

### **1.3.2. Alteraciones de la circulación pulmonar**

Un número elevado de estudios ha documentado cambios en las mediciones hemodinámicas pulmonares en pacientes con SDRA. Estas alteraciones son debidas al

aumento en la resistencia vascular pulmonar (RVP) y consecuentemente en la presión arterial pulmonar (PAP) y están asociadas a un riesgo más elevado de mortalidad [Bull et al., 2010; Price et al., 2012; Ryan et al., 2014]. Muchos mecanismos explican la elevación en la RVP en el SDRA, incluyendo la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH) y la disfunción endotelial.

**Disfunción endotelial.** El endotelio del pulmón tiene diferentes funciones incluyendo el mantenimiento del tono vascular, la regulación de la agregación plaquetaria y la coagulación, el transporte de los leucocitos, la transducción de señales lumenales hacia la pared vascular, la producción de factores de crecimiento y funciones estructurales de barrera (controlando el transporte de agua y solutos) [Mehta and Malik, 2006]. La células endoteliales pulmonares sintetizan y liberan una amplia variedad de mediadores haciendo que en condiciones no patológicas su superficie sea tromboresistente, protegiendo el subendotelio de los factores procoagulantes y de las plaquetas [Maniatis and Orfanos, 2008]. Puesto que, el área de superficie es grande y está próximo a las vías respiratorias, el endotelio microvascular pulmonar puede ser susceptible a daño directo o debido a mediadores circulantes [Wort and Evans, 1999].

La disfunción endotelial implica un desequilibrio en la producción de mediadores vasodilatadores y vasoconstrictores y una transición hacia un fenotipo protrombótico. Los eventos clave en esta transformación son la expresión de moléculas de adhesión para leucocitos y plaquetas en la superficie de las células endoteliales, además de la expresión de los activadores del sistema de coagulación humoral, incluyendo el factor tisular [Scarpatti and Sadler, 1989] y el factor de von Willebrand [Sabharwal et al., 1995]. Tales procesos son modulados por una variedad de estímulos, incluyendo hipoxia, citoquinas y quimioquinas, plaquetas o neutrófilos activados.

La activación del endotelio microvascular pulmonar en el DPA induce la expresión de las moléculas de adhesión derivadas de las células endoteliales (selectina P, selectina E e ICAM-1) y la expresión de los correspondientes ligandos en los neutrófilos (por ejemplo, selectina L e integrinas  $\beta_2$  como CD11/CD18) [Strieter and Kunkel, 1994; Tsokos et al., 2000]. Estas interacciones resultan en un fenómeno de rodamiento mediante el cual las células ruedan a lo largo del endotelio hasta, finalmente, adherirse [Ley et al., 2007]. La estrecha adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales parece ser esencial para la posterior diapédesis. Posteriormente, otras señales siguen la

activación inicial de las células endoteliales y los neutrófilos capturan las plaquetas y los eritrocitos en circulación [Hidalgo et al., 2009]. Las plaquetas activadas liberan mediadores, como el TXA<sub>2</sub>, que activan los neutrófilos, causando vasoconstricción pulmonar y aumento en la permeabilidad vascular [Zarbock et al., 2006]. La agregación de leucocitos y plaquetas contribuye además a la oclusión de los vasos de menor calibre mediante la formación de microembolias.

El endotelio produce varios factores de crecimiento y mediadores vasodilatadores (óxido nítrico, prostaciclina, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio) y vasoconstrictores (endotelina-1, TXA<sub>2</sub>) que regulan las propiedades físicas y bioquímicas de los vasos pulmonares y afectan la contractilidad vascular y el crecimiento de las células de músculo liso vascular (CMLV). En condiciones fisiológicas, un equilibrio entre vasodilatadores y vasoconstrictores regula el tono vascular pulmonar, la homeostasis, la reparación del daño vascular y el crecimiento, mientras que la alteración de este equilibrio lleva a la reducción en la producción de óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y a un incremento en la producción de endotelina-1 (ET-1), serotonina (5-HT) o TXA<sub>2</sub>, que promueven la vasoconstricción y proliferación de las CMLV, modificando la estructura y la contracción de los vasos pulmonares. El estado que se genera es conocido como “disfunción endotelial pulmonar” y contribuye a la alteración del tono vascular, evento presente en muchos trastornos cardiopulmonares como la hipertensión pulmonar (HP) primaria y secundaria, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la insuficiencia cardíaca congestiva y el daño pulmonar agudo (DPA).

Entre los mediadores producidos por el endotelio, el óxido nítrico es un responsable fundamental de la vasorelajación [Cooper et al., 1996]. La óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) cataliza la conversión de la L-arginina a citrulina, produciendo NO [Marletta, 1993]. La eNOS es una oxigenasa dependiente de NADPH que requiere tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), FAD y FMN como cofactores [Forstermann et al., 1994; Moncada et al., 1991]. La síntesis de NO se activa tras la unión con el complejo calcio-calmodulina. En las células endoteliales, la eNOS se localiza preferentemente en dominios especializados de la membrana, denominados balsas lipídicas, y en concreto en las caveolas [Feron et al., 1998; Michel et al., 1997b]. Además, la eNOS está regulada negativamente por la caveolina, el principal componente de las caveolas. Por lo tanto, la estimulación de las células endoteliales con agonistas como la bradiquinina o

la acetilcolina disocia el complejo caveolina-eNOS y permite la unión y la activación de la síntesis de NO por calcio-calmodulina [Feron et al., 1998; Michel et al., 1997b]. Además, la activación de la eNOS puede implicar un mecanismo independiente de calcio mediado por Akt [Ayajiki et al., 1996]. El NO producido activa la guanilato ciclasa y aumenta la concentración de GMP cíclico (GMPc) en las CMLV, causando vasodilatación. El aumento de GMPc activa la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG), que lleva a la extrusión del calcio desde el citosol en las CMLV [Lincoln et al., 1994]. La PKG fosforila los canales del potasio, induciendo hiperpolarización e inhibiendo así la vasoconstricción [Lincoln et al., 1994]. En algunas arterias, el NO es capaz de activar los canales del potasio independientemente de GMPc [Bolotina et al., 1994]. Los niveles de GMPc están controlados y regulados por las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE). La inhibición de NOS con análogos de la L-arginina inhibe la relajación dependiente del endotelio y su administración aguda provoca vasoconstricción [Rees et al., 1990]. El papel de eNOS en la regulación del tono vascular se ha demostrado en modelos animales. Por ejemplo, el tratamiento crónico de ratas con estos compuestos induce hipertensión [Moncada et al., 1991; Rees et al., 1990], mientras que ratones modificados genéticamente para reprimir la eNOS tienen una presión arterial más alta que los controles [Huang et al., 1995]. La sobreproducción de eNOS en ratones transgénicos previene la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia [Ozaki et al., 2001]. Al contrario, la exposición a hipoxia leve resulta en hipertensión pulmonar severa en ratones deficientes de eNOS [Fagan et al., 1999; Steudel et al., 1997]. Sin embargo, estudios en humanos han reportado una producción variable de NO en pacientes con hipertensión pulmonar idiopática, con reducción de expresión de eNOS en vasos pulmonares [Giaid and Saleh, 1995] o aumento en el endotelio de las lesiones plexiformes [Mason et al., 1998]. El NO derivado de la eNOS tiene muchas funciones, por ejemplo, protege contra la vasoconstricción inducida por hipoxia en pulmones [Perrella et al., 1992], inhibe la proliferación de músculo liso, la agregación de las plaquetas [Dinh-Xuan, 1992] y la adhesión de los leucocitos y regula negativamente la producción de ET-1 [Smith et al., 2002]. También regula la expresión génica y la función proteica. Por ejemplo, el NO puede regular la actividad de NF- $\kappa$ B [Peng et al., 1995] y niveles elevados de NO derivados de eNOS se han correlacionado con mejores resultados pulmonares en modelos de endotoxemia, daño por ventilación mecánica e isquemia-reperfusión [Garrean et al., 2006; Takenaka et al., 2006; Zhang et al., 2006]. Al contrario, el NO puede tener también efectos nocivos, como hipotensión y

citotoxicidad [Forstermann and Munzel, 2006]. Estudios en modelos animales parecen apoyar la idea de que la alta producción de NO por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) puede agravar la lesión pulmonar, presumiblemente por efectos directos de los metabolitos altamente reactivos y tóxicos del NO sobre diferentes proteínas y lípidos [Forstermann and Munzel, 2006; Gow et al., 1998]. Un ejemplo es el peroxinitrito, una especie reactiva altamente dañina que deriva de la combinación entre NO y especies reactivas de oxígeno.

Otro potente vasodilatador y antiagregante plaquetario es la PGI<sub>2</sub> [Vane et al., 1990]. La PGI<sub>2</sub> se sintetiza a partir del ácido araquidónico a través de la vía de la ciclooxygenasa en el endotelio vascular y su actividad está mediada por receptores expresados en las CMLV [Coleman et al., 1994]. Los receptores de la PGI<sub>2</sub> están acoplados a la adenilato ciclasa e inducen un aumento de la concentración de AMP cíclico (AMPc) en las CMLV [Webb et al., 2010], que estimula los canales de potasio sensibles a ATP, causando hiperpolarización de la membrana celular e inhibición de la contracción. El aumento del AMPc incrementa también la extrusión de calcio desde el citosol en las CMLV, produciendo vasodilatación [Abe and Karaki, 1992]. Además, la PGI<sub>2</sub> facilita la liberación de NO de las células endoteliales y su acción parece ser potenciada por NO [Delpy et al., 1996], mientras que el aumento de GMPc inhibe la fosfodiesterasa que degrada el AMPc [Delpy et al., 1996], demostrando que el NO prolonga la semivida de la PGI<sub>2</sub>. Aunque la prostaciclina parece no contribuir al mantenimiento del tono basal pulmonar, protege contra la vasoconstricción y el remodelado vascular pulmonar en respuesta a diversos estímulos. Así, la sobreexpresión de la prostaciclina protege a los ratones de la HP inducida por hipoxia crónica [Geraci et al., 1999], mientras que los ratones deficientes en el receptor de la PGI<sub>2</sub> desarrollan una HP exagerada en respuesta a hipoxia crónica [Hoshikawa et al., 2001]. La disminución de los niveles de prostaciclina induce vasoconstricción pulmonar, proliferación de células del músculo liso y coagulación. En estudios realizados en niños y adultos con DPA, se ha observado que la PGI<sub>2</sub> en aerosol mejora la oxigenación [Dahlem et al., 2004; van Heerden et al., 2000]. En otro estudio se ha demostrado que la PGI<sub>2</sub> atenúa los efectos de la trombina, y protege el pulmón en un modelo experimental de ventilación mecánica [Birukova et al., 2006].

Otro producto de la ciclooxygenasa secretada por las plaquetas o células endoteliales es el TXA<sub>2</sub>, que tiene efectos opuestos a la PGI<sub>2</sub> como son la estimulación de la agregación

plaquetaria y la vasoconstricción [Moloney and Evans, 2003]. Cabe destacar que la liberación de TXA<sub>2</sub> por los leucocitos en respuesta a endotoxina parece contribuir al aumento de la presión arterial pulmonar en un modelo de DPA en oveja [Huttemeier et al., 1982].

La endotelina 1 es otro componente vasoactivo importante. La ET-1 es sintetizada como pre-pro-péptido que es posteriormente transformado a Big-ET-1, un péptido de 38 aminoácidos y, por último, a ET-1 a través de la enzima de conversión de la ET-1 (ECE). La fuente principal de ET-1 es el endotelio y su síntesis puede ser inducida por la trombina, la IL-1, el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF-β1), productos derivados de las plaquetas y por neurohormonas como la vasopresina y las catecolaminas [Mombouli and Vanhoutte, 1999]. La ET-1 es un potente vasoconstrictor e induce la agregación de plaquetas. En los mamíferos, se han descrito dos receptores de ET: ET<sub>A</sub>, a través del cual se provoca vasoconstricción y ET<sub>B</sub>, que puede mediar la vasoconstricción en el músculo liso o la vasodilatación actuando sobre las células endoteliales [Zimmermann and Seifert, 1998]. La expresión de ARNm de ambos tipos de receptores de ET-1 se incrementa en modelos animales y pacientes con HP [Frasch et al., 1999; Giaid et al., 1993; Li et al., 1994] y un aumento de la producción de ET-1 se ha encontrado tanto en modelos como en pacientes con DPA [Druml et al., 1993; Kuo and Chen, 1999]. Los antagonistas del receptor de ET-1, como el bosentán, mejoran la sintomatología y prolongan la supervivencia en pacientes con HP y actualmente se utiliza como tratamiento de primera elección en esta patología [Rubin et al., 2002].

El aumento de la RVP que tiene lugar en el DPA refleja la pérdida de control del tono vascular debido a un exceso de mediadores vasoconstrictores pulmonares sobre los vasodilatadores. En modelos animales, la administración directa de endotoxina conduce a aumentos agudos en la resistencia vascular pulmonar, probablemente a través de la inhibición del óxido nítrico [Myers et al., 1994], un fenómeno que puede ser mediado por los receptores B de la endotelina [Rossi et al., 2008] y la sobreproducción de TXA<sub>2</sub>. Trastornos en el equilibrio ácido-base también influyen en la resistencia vascular pulmonar en pacientes con DPA [Fullerton et al., 1996; Mekontso Dessap et al., 2009].

**Vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH).** El aumento de la resistencia es un evento que acompaña a la VPH que es un reflejo fisiológico dirigido a preservar la relación ventilación-perfusión (V/Q) y atenuar la hipoxemia arterial, desviando el flujo

sanguíneo desde las unidades de pulmón pobremente ventiladas (hipóxicas) hacia las zonas mejor ventiladas [Michelakis et al., 2004; Ward, 2007; Waypa and Schumacker, 2005], maximizando la saturación de oxígeno y, por lo tanto, su distribución a los tejidos sistémicos. Por el contrario, las arteriolas sistémicas se dilatan en respuesta a concentraciones de oxígeno reducido para mantener constantes sus niveles en los tejidos. La VPH se mantiene en preparaciones *ex vivo* y en CMLV aisladas, lo que indica que es una propiedad intrínseca de estas células [Sylvester et al., 2012].

Aunque el mecanismo de acción de la VPH no se entiende completamente, es probable que implique la inhibición de los canales de potasio sensibles al oxígeno en el músculo liso vascular, lo que conduce a la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje, la entrada de calcio y la vasoconstricción [Yuan et al., 1993]. Hay múltiples trabajos que sugieren la existencia de un sensor de O<sub>2</sub> que podría ser la cadena de transporte de electrones mitocondrial [Archer et al., 1993; Waypa et al., 2001; Weissmann et al., 2006] y/o la NADPH oxidasa de membrana [Archer et al., 1993; Marshall et al., 1996]. Además, un gran número de evidencias sugieren la implicación de las ERO como intermediarios de señalización. Nuestro grupo ha descrito recientemente que la producción de ceramida derivada de la esfingomielinasa neutra (nSMasa) y la activación de la proteína quinasa C  $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) son eventos tempranos y necesarios para la VPH que conducen a producción de ERO, inhibición de los canales de potasio dependientes de voltaje, despolarización de la membrana celular, abertura de los canales de calcio dependientes de voltaje y vasoconstricción con aumento en la presión pulmonar [Cogolludo et al., 2009a; Frazziano et al., 2011]. Además, la inhibición de la nSMasa previene la VPH *in vivo* y la vía de señalización parece ser específica para las arterias pulmonares de resistencia [Cogolludo et al., 2009a]. Estos datos sugieren que la nSMasa y la PKC $\zeta$  son mediadores clave en la VPH y podrían representar un papel terapéutico en diferentes patologías pulmonares.

Las alteraciones en la VPH tienen una importante relevancia desde el punto de vista patológico [Marshall et al., 1994; Ullrich et al., 1999]. De hecho, la hipoxia alveolar generalizada asociada a altitud, EPOC o apnea del sueño, produce VPH en todo el árbol vascular pulmonar que, si persiste, puede dar lugar a HP e insuficiencia ventricular derecha. Por el contrario, en el SDRA y en la sepsis el fracaso de la VPH resulta en el desacoplamiento de la ventilación-perfusión e hipoxemia arterial grave. En los pacientes con SDRA, la hipoxemia es principalmente el resultado del shunt intrapulmonar, que se produce cuando hay áreas pulmonares no ventiladas por acumulación de líquidos en los

alvéolos (edema pulmonar), pero sí perfundidas, con el consiguiente desacoplamiento V/Q [Dantzker et al., 1979], lo que resulta en una disminución de la PaO<sub>2</sub>. En el DPA por tanto, la VPH tiene efectos protectores [Brimioulle et al., 1996], ya que permite mejorar la saturación de O<sub>2</sub>, a pesar de un aumento leve de la presión pulmonar [Brimioulle et al., 2002; Marshall et al., 1994].

La VPH también se ve afectada en modelos animales de sepsis. Los receptores Toll-like (TLR), que median la inflamación, parecen tener un papel importante en la insuficiencia respiratoria inducida por sepsis. Puesto que la activación de los TLR se asocia con la producción de mediadores inflamatorios, incluyendo el NO, la vasodilatación debida a la sobreproducción de NO liberado por la iNOS ha sido propuesta como un mediador crítico para el deterioro de la VPH. Se ha demostrado que el NO atenúa la respuesta de las arterias pulmonares a hipoxia tanto *in vitro* como *in vivo* [Liu et al., 1991]. Sin embargo, la inhibición de iNOS restaura sólo en parte la respuesta de VPH, lo que sugiere que el fracaso de VPH durante la endotoxemia debe estar mediado, al menos en parte, por mecanismos distintos [Spohr et al., 2005; Ullrich et al., 1999].

### 1.3.3. Permeabilidad vascular pulmonar y edema

Los componentes celulares de la inflamación y la coagulación, a través de complejas interacciones entre plaquetas, leucocitos y células endoteliales, colaboran para resolver la infección del pulmón. Sin embargo, cuando estas interacciones no son equilibradas pueden afectar la barrera alvéolo-capilar [Seeley et al., 2012], evento que conduce a un aumento de la permeabilidad vascular y a la formación de edema. El proceso de difusión de agua desde los capilares hacia los alvéolos implica diferentes barreras, incluyendo los estratos celulares endoteliales y epiteliales, la membrana basal y la matriz extracelular. El aumento de la permeabilidad vascular es el resultado de diferentes mecanismos. En primer lugar, el daño tisular y la consiguiente destrucción de la arquitectura microvascular pulmonar contribuyen al paso de los componentes de la sangre desde los capilares hacia los alvéolos. Por ejemplo, las proteínas de unión estrecha (“*tight junction*”) tienen un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la barrera alvéolo-capilar. Las proteínas transmembrana que pertenecen a la familia de las claudinas representan los principales componentes estructurales de tal barrera y el tipo de composición determina sus propiedades [Overgaard et al., 2012].



Las claudinas-3, -4 y -18 parecen expresarse principalmente en el epitelio alveolar [Koval, 2013] y sus niveles pueden modular el grado de permeabilidad. Por ejemplo, la expresión adecuada de claudina-4 se ha asociado con una función correcta de la barrera alveolar [Rokkam et al., 2011] mientras que niveles elevados de claudina-3 están relacionados con un aumento de la permeabilidad paracelular del epitelio alveolar [Mitchell et al., 2011]. Además, el estrés oxidativo, los patógenos, mediadores inflamatorios o gases nocivos pueden afectar la expresión de estas proteínas, induciendo DPA [Burnham et al., 2012; Olson et al., 2011; Overgaard et al., 2011]. De manera similar al epitelio, las uniones estrechas y adherentes endoteliales están sujetas a modulación por estímulos patológicos durante el DPA [Vandenbroucke et al., 2008]. Por ejemplo, diferentes estímulos inflamatorios, incluyendo citoquinas (IL-8), moléculas vasoactivas (trombina, histamina, bradiquinina o TXA<sub>2</sub>) y el factor VEGF pueden producir hiperpermeabilidad endotelial secundaria a la retracción de las células endoteliales activadas y la formación de pequeños espacios intercelulares (“*gaps*”) [Mehta and Malik, 2006]. Esto conduce a un fallo en la difusión restringida con la consiguiente fuga paracelular de solutos, proteínas y leucocitos.

Estos cambios en la forma celular, se producen cuando las células entran en contacto con mediadores inflamatorios que activan receptores en la superficie de la célula endotelial y activan cascadas de señalización intracelular que inducen el aumento de calcio intracelular y, tras la unión con la calmodulina, activan las quinasas de las cadenas ligeras de miosina (MLCK) y la fosforilación de estas últimas, dando lugar a la reorganización del citoesqueleto y cambios en la morfología de las células endoteliales [Dudek and Garcia, 2001].

La modulación de la reorganización del citoesqueleto por acción de la GTPasa RhoA es también un elemento clave en el aumento la permeabilidad inducida por contracción de las células endoteliales [Dudek and Garcia, 2001, 2003]. La MCLK desempeña también un papel importante en la patofisiología de sepsis tal y como refleja el efecto protector de inhibidores farmacológicos de MLCK (como KT-5720) frente al DPA inducido por endotoxina o ventilación mecánica en pulmones de ratón aislados y perfundidos *ex vivo* [Parker, 2000] o experimentos *in vivo* con ratones deficientes de la forma endotelial [Rossi et al., 2007; Wainwright et al., 2003]. Recientemente se ha demostrado que también la proteína nuclear del grupo de alta movilidad B1 (HMGB1), un mediador tardío de sepsis, induce la formación de “*gaps*” paracelulares endoteliales con reorganización del citoesqueleto de actina [Wolfson et al., 2011].

La función de la barrera alveolar endotelial se regula también por los miembros de la familia de las conexinas (Cx), como Cx43, Cx40 y CX37, que forman los canales de las uniones “gap” en el endotelio y permiten flujo célula-célula de pequeñas moléculas y solutos [Losa et al., 2011; Wang et al., 2012]. Así, se ha observado que Cx43 media el movimiento interendotelial de calcio que aumenta los niveles de expresión de la selectina P, el receptor de adhesión de los leucocitos, contribuyendo a la propagación de la inflamación [Parthasarathi et al., 2006] y que la inhibición de esta conexina con el péptido Gap27 previene el aumento de la permeabilidad endotelial en un modelo de DPA inducido por ácido en rata [Parthasarathi, 2012]. Otro componente crucial para la integridad de la barrera alvéolo-capilar es el glicocálix endotelial, un estrato luminal compuesto por glicoproteínas, glicolípidos, proteoglicanos y glucosaminoglicanos, cuya alteración induce disfunción de la barrera endotelial [Cioffi et al., 2012]. Las células endoteliales se unen a la matriz subyacente por complejos transmembrana de adhesión focal que se componen de integrinas, que regulan la organización del citoesqueleto y también desempeñan un papel importante en la señalización celular. La eliminación de las estructuras de adhesión focal lleva a disfunción de la barrera endotelial [Zebda et al., 2012]. Además, la permeabilidad epitelial y endotelial se regula dinámicamente por un conjunto de moléculas inter e intracelulares, cuya desregulación puede inducir un aumento de la permeabilidad vascular. Por ejemplo, la esfingosina-1-fosfato (S1P) se une a sus receptores S1P<sub>1</sub>, acoplados a proteína G, y regula la permeabilidad vascular a través de la MLCK no-muscular (nmMLCK) y de la vía de señalización mediada por la familia Rho GTPasa [Garcia, 2009], induciendo la reorganización del citoesqueleto y la formación de uniones adherentes y estrechas y de complejos de adhesión focal [Wang and Dudek, 2009]. La angiopoietina 1 (Ang-1) se une a sus receptores tie-2 y estabiliza la vasculatura mediante la activación de Syx y RhoA [Wang and Dudek, 2009]. Por el contrario, la angiopoietina 2 (Ang-2) es producida por las células endoteliales activadas y compite con Ang-1 por la unión a tie-2 y desestabiliza la formación de las uniones vasculares [Eklund and Saharinen, 2013].

Tanto el sistema linfático como los canales de agua a nivel epitelial pulmonar tienen un papel importante en la extracción de agua del espacio extravascular y, por lo tanto, protegen los pulmones frente al desarrollo de edema pulmonar. Sin embargo, cuando la pérdida vascular supera la capacidad de estos sistemas de compensación, la cantidad de fluido que se filtra en los pulmones es mayor de la que se adsorbe y se desarrolla el edema pulmonar. La acumulación de líquido que deriva de este mecanismo puede tener

graves consecuencias sobre la función pulmonar, porque el intercambio eficiente de gases no puede ocurrir cuando los alvéolos y el intersticio están llenos de líquido. El edema pulmonar no cardiogénico está causado por un aumento en la permeabilidad vascular del pulmón, lo que resulta en un aumento del flujo de líquido y proteínas en el intersticio pulmonar y en las vías respiratorias. El edema pulmonar puede ser también secundario a insuficiencia cardíaca, que conduce a un fallo en el retorno del líquido en exceso de la circulación pulmonar con el consiguiente aumento de la presión capilar ("edema cardiogénico") [Ware and Matthay, 2005]. La cantidad neta de edema pulmonar se determina por el equilibrio entre la velocidad a la cual el fluido es filtrado en el pulmón [Staub, 1974] y la velocidad a la cual el fluido se elimina de los espacios aéreos y del intersticio pulmonar [Matthay et al., 2002]. La alteración de la integridad de la barrera alvéolo-capilar en DPA no solo conduce al aumento de la filtración de edema rico en proteínas en los espacios intersticiales y alveolares, también reduce la capacidad del epitelio alveolar de resolver el exceso de líquido del espacio alveolar debido a la disminución del aclaramiento del fluido alveolar [Ware and Matthay, 2001]. En modelos animales de sepsis, la causa más frecuente de SDRA, el fallo del aclaramiento es evidente [Berger et al., 2011; Clerici, 2011]. El principal motor de la reabsorción alveolar de líquidos es un transporte vectorial de  $\text{Na}^+$  que pasa por el epitelio alveolar creando un gradiente de  $\text{Na}^+$  entre las superficies basolaterales y apicales de la monocapa, que a su vez facilita el movimiento de agua fuera del espacio alveolar [Matthay et al., 2002]. El transporte correcto de  $\text{Na}^+$ , debido a dos componentes clave como la ATPasa  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  y el canal de sodio epitelial EnaC, y la reabsorción del edema son elementos determinantes para una mejora evidente de la enfermedad en pacientes con sepsis y SDRA [Ware and Matthay, 2001; Zeyed et al., 2012]. Se ha demostrado también que la ATPasa  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  desempeña un papel fundamental en la regulación de las interacciones célula-célula a nivel del epitelio alveolar y, por lo tanto, de la integridad de barrera [Vadasz et al., 2007].

#### **1.3.4. Resolución y fibroproliferación**

La fase aguda del DPA se caracteriza por la inflamación, daño celular, apoptosis o necrosis de las células que componen la barrera alvéolo-capilar y la formación de edema pulmonar. En la fase de resolución se produce la reparación del epitelio alveolar y la reducción del edema pulmonar. Las células epiteliales alveolares de tipo II proliferan

para recubrir la membrana basal alveolar dañada y posteriormente, se diferencian en células de tipo I. La extracción del líquido del edema desde los espacios aéreos depende del transporte activo del pulmón de cloruro y de sodio a través de la barrera epitelial alveolar. Los sitios primarios de la reabsorción de sodio y cloruro son los canales iónicos epiteliales situados en la membrana apical de las células epiteliales alveolares de tipo I y II y en los epitelios de las vías respiratorias distales. El sodio es activamente extruido en el espacio intersticial por medio de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  situada en la membrana basolateral de las células de tipo II. El agua sigue pasivamente, probablemente a través de las acuaporinas, que son canales de agua que se encuentran predominantemente en las células epiteliales alveolares de tipo I [Matthay et al., 2002]. Además del líquido alveolar, el exceso de proteínas también debe ser eliminado desde los espacios alveolares para la resolución y recuperación, aunque los mecanismos de eliminación no están todavía claros. Las proteínas pueden ser eliminadas mediante endocitosis y transcitosis por las células epiteliales alveolares de tipo I y por fagocitosis por macrófagos. Recientemente se ha observado que el exceso de albúmina intra-alveolar puede ser resuelto por las células epiteliales alveolares mediante un proceso de endocitosis mediado por clatrina después de la unión de la albúmina al receptor multiligando de la megalina [Buchackert et al., 2012; Yumoto et al., 2006]. El sistema parece tener la capacidad necesaria para eliminar grandes cantidades de albúmina alveolar [Buchackert et al., 2012], demostrando su relevancia en la regulación del equilibrio del líquido epitelial alveolar en DPA.

Recientes estudios se han centrado en el equilibrio entre apoptosis y proliferación celular, reparación de la membrana plasmática dañada y migración celular. Por ejemplo, en el modelo de daño pulmonar inducido por ventilación (VILI), la membrana plasmática de las células epiteliales alveolares se daña y contribuye a la patogénesis de VILI, iniciando o agravando las respuestas inflamatorias. Está bien descrito que la mayoría de las células tienen la capacidad de reparar sus membranas, pero todavía no se conocen bien los mecanismos implicados [Oeckler and Hubmayr, 2008]. Además, se ha observado que la reparación de las membranas dañadas requiere la interacción coordinada entre el transporte de membrana endocítico o exocítico (*trafficking*) y la remodelación de la actina [Godin et al., 2011] y que tal proceso de reparación implica la translocación de caveolina-1 dependiente de la quinasa Src hacia la membrana plasmática para mediar la endocitosis caveolar [Jin et al., 2011; Wang et al., 2011]. El mecanismo molecular de migración celular inducido por la lesión, que es necesario para

reparar y cubrir los sitios de daño, está mediado por la inhibición del homólogo de la tensina y la fosfatasa PTEN y la activación de las vías de Akt y ERK, disminuyendo la rigidez de las células, lo que resulta en deformaciones celulares más grandes y el aumento de la movilidad celular [Mihai et al., 2012]. De forma similar, TNF- $\alpha$  induce la migración celular, pero reduce la proliferación celular tras daño [Maille et al., 2011].

Algunos pacientes no progresan a la fase de resolución, desarrollando alveolitis fibrosante, con evidente fibrosis en las autopsias de aproximadamente el 55% de los no sobrevivientes de SDRA [Meduri, 1993]. Esto ocurre por la presencia en los espacios alveolares de células inflamatorias, vasos sanguíneos y la deposición anormal y excesiva de proteínas de la matriz extracelular, especialmente fibras de colágeno [Rocco et al., 2009]. La fibrosis intersticial y alveolar se asocia con disminución en la distensibilidad pulmonar (*compliance*) y resolución parcial del edema pulmonar con hipoxemia continua. La proliferación de los neumocitos, fibroblastos y miofibroblastos y la deposición de matriz extracelular, que suelen verificarse en esta fase fibroproliferativa, agravan el estado de salud de pacientes con SDRA [Marshall et al., 2000]. La transición epitelio-mesenquimal (EMT), que consiste en la conversión de células epiteliales en células migratorias, la migración de fibroblastos pulmonares residentes, la proliferación, la transdiferenciación en miofibroblastos y el reclutamiento de fibrocitos son eventos que tienen lugar en la fase fibroproliferativa de DPA [Burnham et al., 2014]. Los receptores de los productos finales de glicación avanzada (RAGE) parecen tener un papel importante en la propagación y adhesión de las células epiteliales alveolares [Calfee et al., 2008; Guo et al., 2012; Hergueter et al., 2011]. De hecho, mientras que en condiciones basales los RAGE se unen al citoesqueleto mediante la interacción con la familia de las proteínas ezrina/radixina/moesina (ERM), que hacen de intermediarios entre la membrana plasmática y el citoesqueleto, en presencia de citoquinas inflamatorias, esta interacción se interrumpe por fosforilación de ERM y su consiguiente interacción con CD44 y las fibras de estrés de actina, causando la pérdida de adhesión y el fenotipo de migración que contribuye a la EMT [Buckley et al., 2011]. Un reciente trabajo ha revelado que la expresión de la proteína del surfactante pulmonar tipo D (SP-D) también desempeña un papel importante en la regulación de la EMT en un modelo de DPA inducido por bleomicina [Sakamoto et al., 2012]. Recientes estudios han demostrado un papel central de los linfocitos T reguladores en la resolución de la fibroproliferación en DPA, mediante la reducción del reclutamiento de los fibrocitos mediada por CXCL12-CXCR4 [Garibaldi et al., 2013].

Se ha descrito también que la matriz extracelular (MEC) puede ser degradada por proteólisis mediada por proteasas lo que da lugar a la liberación de los fragmentos generados. Además de un impacto evidente en la estructura de la MEC, estos fragmentos tienen actividades biológicas que afectan las enfermedades pulmonares [Burgess and Weckmann, 2012]. Por ejemplo, el papel de los fragmentos derivados de la degradación del hialuronano en la patogénesis del DPA ha sido recientemente descrito [Eldridge et al., 2011; Jiang et al., 2011]. En un pequeño estudio *post-mortem* de pulmones derivados de pacientes con insuficiencia respiratoria grave, Zapol y sus colaboradores han demostrado que existe una creciente destrucción del lecho capilar a medida que avanza el SDRA que podría contribuir a los aumentos en la RVP detectados en estos mismos pacientes *ante-mortem* [Zapol et al., 1977]. Muchos mediadores se han relacionado con la respuesta fibroproliferativa, pero los que tienen una asociación más relevante con los efectos vasculares incluyen angiotensina II y el VEGF [Azamfirei et al., 2010; Medford and Millar, 2006; Yang et al., 1996]. El grupo de Tomashefski ha observado también una amplia remodelación vascular en el SDRA y una obliteración fibrocelular de las arterias, venas y vasos linfáticos [Tomashefski et al., 1983]. En la fase fibroproliferativa el remodelado vascular se asocia con arterias y venas distorsionadas y tortuosas. Estos canales vasculares tortuosos se concentraron en regiones de fibrosis densa o irregular. El número de capilares se reduce y frecuentemente se encuentran dilatados. La muscularización de las arterias se presenta muy marcada en esta fase y la disrupción mecánica del curso de los vasos sanguíneos es probable que contribuya a la elevación sostenida en la RVP observada en los pacientes que no sobreviven.

#### **1.4. Biomarcadores de DPA**

La gravedad y las características del DPA pueden ser determinadas mediante una gran variedad de marcadores. Un marcador ideal tendría que indicar una clara relación con el evento fisiopatológico y también ser fiable, reproducible, específico de la enfermedad y relativamente económico. Las concentraciones de estas sustancias se deberían poder determinar en orina, sangre o plasma (suero), líquido de lavado broncoalveolar (LBA) o aspirado traqueal. El aumento o la disminución de los niveles de los marcadores individuales debería ser útil para el diagnóstico y la predicción de la mortalidad o para

monitorizar la respuesta al tratamiento. Los biomarcadores de DPA que se han identificado en diversos estudios se recogen en la tabla 1.

**Tabla 1. Biomarcadores de DPA.** RAGEs, receptores de los productos finales de glicación avanzada; SP-A/D, proteína del surfactante A/D; KL-6, proteína Krebs von den Lungen 6; CCSP, proteína secretada por las células de Clara; vWF, factor de von Willebrand; sICAM-1, forma soluble de la molécula de adhesión intercelular 1; Ang-1/2, angiopoietina 1/2; IL-1 $\beta$ , IL-6 y IL-8, interleuquinas 1beta, 6 y 8; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral alfa; sTNF-R1/II, receptor I/II de TNF soluble; HMGB-1, proteína nuclear del grupo de alta movilidad B1; LBP, proteína de unión al lipopolisacárido; CRP, proteína C reactiva; ERO, especies reactivas de oxígeno; ERN, especies reactivas de nitrógeno; PAI-1, inhibidor 1 del activador del plasminógeno; KGF, factor de crecimiento de queratinocitos; HGF, factor de crecimiento de los hepatocitos; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; N-PCP-III, péptido del procolágeno aminoterminal de tipo III.

Marcador	Cambio	Comentario	Referencias
RAGEs	↑	Marcador temprano en plasma	[Jabaudon et al., 2011; Mauri et al., 2010]
SP-D	↑	plasma	[Eisner et al., 2003; Ware and Matthay, 2000]
SP-D	↓	LBA	[Cheng et al., 2003]
SP-A	↑	Plasma	[Cheng et al., 2003]
KL-6	↑	Plasma o LBA	[Ishizaka et al., 2004]
CCSP	↑	Suero (marcador de daño bronquial)	[Determann et al., 2009; Lesur et al., 2006]
vWF	↑	Plasma o LBA	[Ware et al., 2004]
sICAM-1	↑	Plasma o LBA	[Calfee et al., 2009]
Ang-2/Ang-1	↑	Plasma o suero	[Gallagher et al., 2008; Ong et al., 2010; Wada et al., 2013]
Selectina-E	↑	Plasma	[Okajima et al., 2006]

<b>Marcador</b>	<b>Cambio</b>	<b>Comentario</b>	<b>Referencias</b>
Laminina, desmosina	↑	Marcador de daño en matriz extracelular	[Katayama et al., 2010; McClintock et al., 2006].
ADN	↑	LBA	[Joyner et al., 2013]
Histonas	↑	LBA	[Abrams et al., 2013]
IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 o IL-8	↑	LBA	[Armstrong and Millar, 1997; Bouros et al., 2004; Cross and Matthay, 2011; Donnelly et al., 1993; Donnelly et al., 1996; Meduri et al., 1995; Park et al., 2001; Raymondos et al., 2012; Wiedermann et al., 2004]
IL-10	↓	LBA	
sTNF-RI/II	↑	Plasma	[Parsons et al., 2005]
HMGB1	↑	Plasma	[Cohen et al., 2009]
LBP	↑	Suero	[Villar et al., 2009]
CRP	↑	Protector en plasma	[Bajwa et al., 2009]
ERO, ERN	↑	Plasma y LBA	[Sittipunt et al., 2001; Sznajder et al., 1989; Winterbourn et al., 2000; Zhu et al., 2001]
Albúmina, transferrina	↓	Plasma	[Aman et al., 2011]
Uroquinasa	↓	LBA	[Bertozzi et al., 1990]
PAI-1	↑	LBA	[Bertozzi et al., 1990].
Trombomodulina	↑	LBA	[Ware et al., 2003]
KGF	↑↓	LBA	[Chandel et al., 2009; Stern et al., 2000; Verghese et al., 1998]
HGF	↑	LBA	[Stern et al., 2000; Verghese et al., 1998]



Marcador	Cambio	Comentario	Referencias
VEGF	↑↓	Plasma o LBA	[Thickett et al., 2001; Thickett et al., 2002]
N-PCP-III	↑	Suero y LBA Marcador de la producción del colágeno	[Chesnutt et al., 1997; Clark et al., 1995; Marshall et al., 2000]

### 1.5. Tratamientos

El SDRA no tiene un tratamiento farmacológico específico y, de hecho, los fármacos probados hasta ahora no han mejorado la supervivencia de los pacientes. De hecho, los progresos terapéuticos más significativos se asocian con una ventilación mecánica mejorada, colocación de los pacientes en posición decúbito prono, o la adecuada gestión de fluidos.

Una estrategia que ha demostrado aumentar la supervivencia de los pacientes con SDRA es la ventilación mecánica protectora. El uso de pequeños volúmenes corrientes (VT o volumen tidal) (6 ml/kg de peso corporal) resulta en la reducción de marcadores de inflamación, un aumento de la supervivencia y menor incidencia de fallo multiorgánico que los volúmenes corrientes elevados [Wheeler and Bernard, 2007]. Este protocolo de ventilación constituye una medida de apoyo cuyos principales objetivos son mejorar y garantizar una ventilación alveolar adecuada, una buena oxigenación y reducir el trabajo respiratorio. Se considera eficaz cuando mantiene una presión parcial del oxígeno ( $\text{PaO}_2$ ) > 60 mmHg, una saturación del 90% y un pH normal. Por lo tanto, esta estrategia ventilatoria intenta proteger el pulmón de los efectos deletéreos de la presión positiva sobre las vías aéreas y optimizar el reclutamiento alveolar sin producir mayor daño al tejido pulmonar [Neto et al., 2012]. El uso de VT bajos combinado con la eliminación extracorpórea de  $\text{CO}_2$  parece reducir el daño pulmonar asociado a la ventilación.

Además, la limitación de la presión meseta (menos de 28-30 cm  $\text{H}_2\text{O}$ ), que es la presión de la vía aérea cuando ha finalizado la entrada de aire y aun no se ha iniciado la espiración, y una presión positiva al final de la espiración (PEEP) adecuada son componentes clave de una estrategia ventilatoria pulmonar protectora. La PEEP es el mantenimiento artificial en la vía aérea de una presión positiva superior a la

atmosférica, después de una espiración completa, que permite el paso de aire hacia los pulmones, donde la presión es menor, impidiendo el colapso alveolar y mejorando la oxigenación.

Otra estrategia es colocar a los pacientes en posición prona. Este sencillo procedimiento mejora la oxigenación de los pacientes, disminuyendo el porcentaje de tejido atelectásico y se asocia con mejores resultados clínicos en pacientes con SDRA [Guerin et al., 2013]. Estudios en modelos animales sugieren que la posición prona puede limitar el tamaño del daño pulmonar experimental [Pelosi et al., 1998]. Actualmente, esta terapia resulta atractiva por su bajo coste, alto rendimiento y escasos efectos adversos, aunque debe ser empleada precozmente en el curso de la enfermedad. La práctica es también segura con la excepción de un posible mayor riesgo de regurgitación y extubación accidental [Messerole et al., 2002]. Otra desventaja es que la mejora en la oxigenación inducida por la posición prona parece ser transitoria y ningún estudio demuestra que esta práctica aumente la supervivencia o reduzca las horas de ventilación en la UCI. El fracaso de esta estrategia en el aumento de la supervivencia podría deberse a que la mayoría de los pacientes con DPA no mueren por hipoxemia refractaria, sino por fallo orgánico múltiple [Montgomery et al., 1985]. Por lo tanto, las mejoras en la oxigenación probablemente podrían resultar importantes para la supervivencia solo de algunos pacientes. En cualquier caso, con los datos actuales, la posición prona se puede proponer como práctica de rutina en todos los pacientes.

La oxigenación con membrana extracorpórea (ECMO) es un circuito de bypass cardiopulmonar universalmente aceptado para el tratamiento de neonatos y niños con insuficiencia respiratoria y cardíaca severa, que no responden al tratamiento convencional. Esta práctica consiste en un dispositivo por el cual, mediante el paso de la sangre del paciente por un oxigenador de membrana, se asegura el intercambio de gases. Se usa más en los niños y raramente en los adultos. Esta estrategia permite mejorar la oxigenación de la sangre y la eliminación de CO<sub>2</sub>, pero parece que no mejora la supervivencia o el tiempo de ventilación [Brunet et al., 1993; Morris et al., 1994; Zapol et al., 1979]. Además, la ECMO se ha también asociado con riesgos sustanciales, como infección y pérdida de sangre y con costos altos, razón por la cual se suele usar como último recurso.

El control de líquidos es otro tipo de estrategia usada para el tratamiento de SDRA. Debido a un aumento en la permeabilidad vascular y epitelial en SDRA, es difícil conseguir una adecuada gestión de fluidos en pacientes con shock séptico y SDRA. Un tratamiento dirigido hacia la disminución de la presión hidrostática intravascular, a través de la restricción del aporte de fluidos y el aumento de la diuresis, podría disminuir el edema pulmonar y, por lo tanto, mejorar el intercambio gaseoso y reducir el tiempo de ventilación mecánica, pero no estaría exento del riesgo de empeorar la función de órganos no pulmonares como consecuencia de una disminución de la perfusión tisular. Estudios en modelos animales sugieren que la reducción del líquido pulmonar mejora la oxigenación y la distensibilidad pulmonar [Humphrey et al., 1990]. Ensayos clínicos muestran mejores condiciones fisiológicas tras el uso de diuréticos que reducen la cantidad de agua pulmonar [Davey-Quinn et al., 1999; Humphrey et al., 1990]. Sin embargo, la administración de líquidos es altamente recomendada después de la estabilización hemodinámica en pacientes con SDRA. En pacientes hemodinámicamente inestables, el control dinámico del equilibrio del líquido pulmonar debe aplicarse para guiar la administración de fluidos en los pacientes con SDRA [Huh and Koh, 2013]. Muchos datos sugieren que la inmediata administración de líquidos en pacientes hemodinámicamente inestables mejora su estado de salud, pero si se realiza en una fase demasiado tardía, podrían ser peligrosos [Rivers et al., 2001; Yu et al., 1993]. Ejemplos de líquidos son los cristaloides (Ringer Lactato) y los coloides (albumina). Puesto que estos protocolos de reanimación mejoran la función pulmonar, reducen la duración de la ventilación mecánica y de la estancia en UCI, se han evaluado como posibles terapias.

En un reciente estudio se ha observado que el uso de bloqueantes neuromusculares (BNM) mejora el pronóstico de pacientes con SDRA [Alhazzani et al., 2013]. Puesto que los pacientes con insuficiencia respiratoria aguda suelen requerir un complicado manejo ventilatorio, se ha demostrado que la administración de los BNM añadidos a una adecuada sedación permite conseguir una correcta adaptación a la ventilación mecánica. Los BNM provocan la mejoría de la distensibilidad pulmonar, disminuyen la presión pico de la vía aérea (presión máxima registrada al final de la inspiración y determinada fundamentalmente por el flujo inspiratorio y la resistencia de las vías aéreas), lo que mejora la oxigenación y reduce el riesgo de barotrauma.

El empleo de vasodilatadores también se ha analizado para el tratamiento del DPA. Por ejemplo, el NO inhalado es un potente vasodilatador pulmonar selectivo, capaz de reducir la RVP y mejorar el gasto cardiaco, que es el volumen de sangre bombeado por el corazón en un minuto, en pacientes con DPA y fracaso del ventrículo derecho [Bhorade et al., 1999; Bigatello et al., 1994; Fierobe et al., 1995]. La administración continua de NO puede reducir la RVP, pero la oxigenación puede empeorar a dosis altas de NO [Gerlach et al., 2003]. En modelos animales se ha demostrado también que el NO inhalado puede mejorar la relación V/Q y aumentar la oxigenación arterial [Ogura et al., 1994], mientras que en otros estudios experimentales se ha observado que disminuye la formación del edema pulmonar y el reclutamiento de los neutrófilos en pulmón [Ogura et al., 1994]. En otros trabajos se ha demostrado también que el NO induce un aumento en el ratio  $PaO_2/FIO_2$  y una reducción del *shunt* o cortocircuito intrapulmonar, reduciendo la hipoxemia [Zapol et al., 1994]. La inhalación de NO tiene algunas limitaciones, incluyendo el alto coste, la asociación con daño renal agudo [Adhikari et al., 2007] y la acumulación de metabolitos tóxicos [Griffiths and Evans, 2005]. La prostaciclina ( $PGI_2$ ) inhalada también induce vasodilatación pulmonar selectiva y redistribuye el flujo sanguíneo desde las áreas de *shunt* hacia las mejor ventiladas, mejorando el ratio  $PaO_2/FIO_2$  [Walrath et al., 1996], pero no tiene efectos sobre el gasto cardiaco y la función ventricular derecha [Zwissler et al., 1996]. Como el NO, la  $PGI_2$  tampoco mejora la supervivencia en los pacientes con SDRA. Los vasodilatadores también se han administrado por vía intravenosa en pacientes con daño pulmonar para intentar aumentar el gasto cardiaco y la  $PaO_2$ , pero presentan desventajas que limitan su uso terapéutico. De hecho, la mayoría no tienen selectividad por la circulación pulmonar y, por lo tanto, causan hipotensión y además, actúan sobre todos los vasos pulmonares, tanto en áreas ventiladas como no ventiladas. El efecto neto de estos es un aumento en el *shunt* que lleva al deterioro en la oxigenación [Leeman, 1991; Pierpont et al., 1980].

Entre los fármacos antiinflamatorios, los glucocorticoides (GCs) son los más estudiados como tratamiento en SDRA. En los últimos 20 años, se han producido avances significativos en la comprensión de los mecanismos de acción de los glucocorticoides. Datos clínicos, derivados del tratamiento prolongado de glucocorticoides con dosis bajas en pacientes con SDRA, han demostrado una mejora significativa en la inflamación y en la fisiología pulmonar con un perfil beneficio/riesgo favorable

[Chadda and Annane, 2002]. Los glucocorticoides modulan casi todos los pasos del proceso inflamatorio a través de vías genómicas y no genómicas. Los GCs inhiben también la fibrogénesis [Meduri et al., 1991] y la activación de neutrófilos, estimulan la apoptosis de las células T, los eosinófilos y monocitos y son importantes en el mantenimiento de la integridad endotelial y de la permeabilidad vascular [Thompson, 2003]. En los pacientes con SDRA, dosis moderadas de glucocorticoides se asocian con una reducción significativa en la unión al ADN del factor nuclear NF- $\kappa$ B y en la transcripción del TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 [Meduri et al., 2002; Rocco et al., 2003]. En modelos animales de DPA, la administración temprana de glucocorticoides ha mostrado efectos protectores en el parénquima pulmonar [Rocco et al., 2003]. En ensayos clínicos aleatorizados [Confalonieri et al., 2005; Meduri et al., 2007; Meduri et al., 1998], el tratamiento prolongado con glucocorticoides en dosis moderadas mejora el intercambio de gases, atenúa el daño pulmonar y reduce la duración de la ventilación mecánica en pacientes con DPA. El tratamiento con glucocorticoides impide la difusión de la inflamación a los órganos extrapulmonares y disminuye la prevalencia de la disfunción cardiovascular [Chadda and Annane, 2002; Steinberg et al., 2006]. Sin embargo, el efecto del tratamiento prolongado de glucocorticoides sobre la supervivencia en el SDRA sigue siendo controvertido. En algunos estudios se ha observado un aumento en la supervivencia en pacientes con SDRA, mientras que en otros [Steinberg et al., 2006] no se ha encontrado ningún beneficio en la supervivencia, e incluso se ha sugerido que cuando los glucocorticoides se administran en una fase más tardía, después de 2 semanas de la progresión de la enfermedad, pueden causar daño.

Además de los tratamientos descritos, actualmente se están desarrollando nuevas terapias para tratar el SDRA que consisten en la modulación de vías celulares o programas transcripcionales clave. Una de estas terapias se basa en el uso de estatinas, inhibidores de la enzima implicada en la síntesis de colesterol, la reductasa HMG-CoA. Normalmente se aplican para la prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, pero las estatinas también ejercen efectos antiinflamatorios, inmunomoduladores y antioxidantes, principalmente en células endoteliales. Las estatinas promueven la reorganización del citoesqueleto celular endotelial, aumentan la integrina endotelial  $\beta$ 4, disminuyen el estrés oxidativo, reduciendo la actividad de la NADPH oxidasa y, afectan la expresión de diferentes genes implicados en DPA (integrina  $\beta$ 4, quimioquinas) [Chen et al., 2012; Singla and Jacobson, 2012]. En

diferentes modelos murinos de DPA, se ha observado que las estatinas atenúan las respuestas inflamatorias pulmonares a diferentes niveles a través de una reducción en la filtración vascular y en modelos animales de VILI, mejoraron la función de la barrera alvéolo-capilar e inducen un aumento en la distensibilidad pulmonar [Chen et al., 2012; Singla and Jacobson, 2012; Zhang et al., 2011]. Con respecto al uso clínico, un estudio ha demostrado que pacientes con DPA tratados con estatinas, tienen niveles más bajos de disfunción orgánica y sepsis, una vez ingresados en la UCI, pero el uso de estatinas no altera el curso clínico posterior de la enfermedad [Kor et al., 2009]. En otro estudio de pacientes en estado crítico, el uso de estatinas se ha asociado a una reducción en el desarrollo de DPA y sepsis [O'Neal et al., 2011]. Además, se ha evaluado los efectos de la simvastatina en humanos después de la inhalación de endotoxinas y se ha observado reducciones significativas en la cantidad de neutrófilos y en la concentración de mieloperoxidasa y TNF- $\alpha$  en LBA [Shyamsundar et al., 2009]. Por último, un ensayo clínico de fase 2 ha demostrado que el tratamiento con simvastatina es seguro y puede asociarse con una mejora en la disfunción orgánica en DPA, debida probablemente a la reducción de la inflamación pulmonar y sistémica [Craig et al., 2011].

Recientemente, muchas publicaciones han demostrado que el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es altamente protector en diferentes modelos de DPA, incluyendo la infección por *K. pneumoniae*, la neumonía vírica y el DPA inducido por LPS [Quinton, 2012]. El GM-CSF es un factor de crecimiento que induce la proliferación mieloide, diferenciación y polarización de macrófagos y células dendríticas en diferentes órganos, incluyendo el pulmón. Por su acción sobre los macrófagos alveolares, contribuye a la homeostasis del surfactante [Malur et al., 2011; Nei et al., 2012]. Una fuente importante de GM-CSF en pulmón es el epitelio alveolar [Cakarova et al., 2009; Mir-Kasimov et al., 2012; Unkel et al., 2012]. El factor GM-CSF protege el huésped tanto en la fase temprana de la infección pulmonar como en la fase de regeneración del epitelio pulmonar. El GM-CSF alveolar promueve la eliminación bacteriana o viral, mediante la expansión de los macrófagos alveolares o de las células dendríticas pulmonares migratorias CD103<sup>+</sup>, o estimulando su capacidad de defensa del huésped [Huang et al., 1995; Standiford et al., 2012; Unkel et al., 2012]. Con respecto a sus efectos directos sobre la barrera pulmonar, se ha demostrado que el GM-CSF ejerce efectos anti-apoptóticos y por lo tanto protege las células epiteliales alveolares contra el daño mitocondrial inducido por estrés oxidativo a través de la vía de

Akt [Sturrock et al., 2012]. Estudios *in vivo* han revelado que el GM-CSF induce la proliferación de las células alveolares de tipo II y es indispensable para restaurar la función de la barrera tras el daño inducido por LPS [Cakarova et al., 2009]. Estos estudios sugieren que el GM-CSF mejora la defensa del huésped, atenúa la lesión de células epiteliales, promueve la reparación del epitelio y mejora la función de la barrera y el intercambio de gases en DPA. Además, los ratones que sobreexpresan GM-CSF en células epiteliales alveolares están fuertemente protegidos de la infección y lesión [Cakarova et al., 2009; Garibaldi et al., 2013], sugiriendo un papel terapéutico de GM-CSF. En la aplicación clínica, los niveles de GM-CSF en LBA se han asociado con mejoras en pacientes con SDRA [Matute-Bello et al., 2000]. En cuanto a los pacientes con sepsis y DPA inducido por sepsis, un estudio ha revelado que la administración sistémica de GM-CSF mejora la función respiratoria [Presneill et al., 2002], mientras que otro ensayo más reciente no ha mostrado ningún beneficio significativo de la administración intravenosa de GM-CSF [Paine et al., 2012]. Puesto que concentraciones alveolares elevadas de GM-CSF se asocian con protección contra el daño pulmonar en modelos animales y en humanos, la administración local de GM-CSF podría representar una estrategia de tratamiento, particularmente en pacientes con DPA asociado a patógenos.

Por último, otra posible terapia para el DPA son las células madre mesenquimales (MSCs). En modelos experimentales de SDRA, la inyección de MSCs ha mejorado la regeneración del tejido pulmonar [Chimenti et al., 2012; Curley et al., 2012]. Los beneficios de estas células derivan no sólo de su incorporación en el pulmón dañado, sino también de su interacción con células pulmonares dañadas y de su modulación inmunológica [Gotts and Matthay, 2011]. Se ha observado también que las MSCs son capaces de restaurar la permeabilidad epitelial alveolar en cultivos primarios de células epiteliales alveolares humanas, a través de un proceso mediado por la angiopoietina-1 [Fang et al., 2010]. Las MSCs secretan diferentes moléculas efectoras, incluyendo citoquinas antiinflamatorias, factores de crecimiento y péptidos antimicrobianos. Estos efectores atenúan el aumento de la permeabilidad endotelial y epitelial, el edema pulmonar, la inflamación y la infección [Fang et al., 2010; Gupta et al., 2012; Krasnodembskaya et al., 2010; Matthay et al., 2012] y también parecen inducir el fenotipo antiinflamatorio M2 en los macrófagos [Ionescu et al., 2012]. Las MSCs también pueden transferir material genético y mitocondrias funcionales a las células

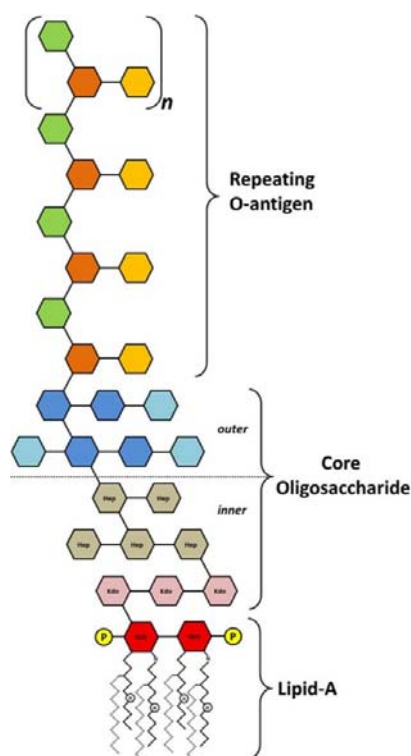
dañadas. De hecho, en modelos de DPA inducido por LPS, se ha demostrado que se produce esta transferencia de mitocondrias a través de la formación de uniones comunicantes o *gap* ricas en conexina 43 (Cx43) con el epitelio alveolar y mediante la liberación de microvesículas, que contienen las mitocondrias, hacia los epitelios [Islam et al., 2012]. Al llegar al sitio dañado, las MSCs liberan factores específicos y consiguen atenuar la infección o la lesión alveolar. Aunque el mecanismo molecular de estos procesos no está todavía claro, la terapia celular con MSC humanas alogénicas es considerada como una de las estrategias más prometedoras para el tratamiento de DPA/SDRA [Matthay et al., 2012].

## **1.6. Modelos animales de DPA**

### **1.6.1. Modelo de DPA inducido por lipopolisacárido (LPS)**

El lipopolisacárido (LPS) es un glicolípido, presente en la membrana externa de las bacterias gram-negativas. El LPS consiste en una porción de oligo- o polisacáridos que son respectivamente el núcleo (*core*) y el antígeno O, compuesto de una cadena de disacáridos repetidos y anclada a la parte externa de la membrana bacteriana por un región hidrófoba llamada lípido-A. Este último se conserva estructuralmente entre las diferentes clases de bacterias, a diferencia del antígeno O que presenta una gran diversidad estructural (figura 4) [Serrato, 2014].





**Figura 4.** Representación esquemática de la estructura general del LPS. Tomado de Serrato RV, 2014.

La mayoría de los efectos biológicos del LPS se reproducen por acción del lípido A [Schromm et al., 2000], aunque la presencia o ausencia del antígeno O influye en la magnitud de la respuesta [Kelly et al., 1991]. En el suero, el LPS se une a proteínas de unión específicas para el LPS (LBP) [Martin et al., 1992; Tobias et al., 1986] formando un complejo LPS-LBP que activa la estructura del receptor CD14/TLR4, provocando la activación de mediadores intracelulares tales como proteínas quinasas y factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B, y la producción de mediadores inflamatorios [Tapping et al., 2000; Wright et al., 1990; Yang et al., 1998]. El LPS es un importante mediador de la sepsis en respuesta a bacterias gram-negativas, y la administración sistémica de LPS fue una de las primeras estrategias utilizadas para demostrar las consecuencias de la sepsis bacteriana. Después de la administración intravenosa de LPS, el endotelio capilar es el sitio inicial de lesión. El daño celular inducido por LPS parece estar relacionado a la apoptosis de las células endoteliales y se desarrolla rápidamente después de su administración [Fujita et al., 1998; Wang et al., 2007]. El tratamiento sistémico con el inhibidor de caspasa Z-VAD-fmk bloquea la apoptosis y mejora la supervivencia en ratones tratados con LPS por vía intravenosa [Fujita et al., 1998]. La respuesta hemodinámica a LPS administrado por vía intravenosa se caracteriza por una fase

inicial de leucopenia, disminución del gasto cardíaco, y una caída en la presión arterial. Se produce también un aumento en la presión arterial pulmonar. Esta fase inicial (las primeras 4-6 horas) se continúa por una lenta mejoría en el número de leucocitos y en el perfil hemodinámico. Los cambios a nivel pulmonar empiezan a ser evidentes dentro de 2-4 horas e incluyen hipoxemia [Matute-Bello et al., 2008]. En los pulmones, la administración de LPS, por vía intravenosa o intra-alveolar, produce cambios en la deformabilidad de los polimorfonucleares (PMN) y el atrapamiento de los PMN en los capilares pulmonares [Reutershan et al., 2007]. Tras la administración intravenosa solo un pequeño número de PMN migra hacia las vías aéreas [Azghani et al., 2000; Wiener-Kronish et al., 1991; Wiggs et al., 1994]. Al contrario, la administración intratraqueal (IT) de LPS da lugar a grandes aumentos en los PMN en las vías respiratorias. El LPS se ha administrado también a voluntarios humanos sanos por vía intravenosa e intratraqueal. Dosis intravenosas de 2-4 ng/kg se asocian con inflamación sistémica y presencia de macrófagos alveolares [Hollenstein et al., 2000; Pugin et al., 1999]. La instilación intratraqueal de LPS a dosis que van desde 1 hasta 4 ng/kg produce en una fase temprana aumentos en el LBA de PMN, albúmina y citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF, IL-8, ENA-78, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , y MIP-1 $\beta$ ) y en una fase posterior (24-48 horas después de la instilación) se normaliza la cantidad de citoquinas y el aumento en LBA de PMN, monocitos, macrófagos y linfocitos [O'Grady et al., 2001]. Entre otras ventajas, la instilación intratraqueal del LPS, produce daño directo al pulmón, pero también presenta desventajas, cuales la difusión incompleta del instilado y la no reproducibilidad de los efectos de propagación del patógeno.

Desde el punto de vista técnico, las respuestas a LPS son muy variables entre las especies y difieren en animales por la presencia o la ausencia de macrófagos intravasculares pulmonares (MIPs). Los MIPs se adhieren a las células endoteliales de los capilares pulmonares. Los MIPs se encuentran en los pulmones de muchas especies, incluyendo ovejas, vacas, cerdos, gatos, cabras, caballos y cetáceos. Los animales con MIPs desarrollan sepsis y lesión pulmonar con dosis de LPS muy pequeñas (en el rango de  $\mu\text{g/kg}$ ) y al contrario, los animales sin MIPs requieren dosis mucho más altas (en el rango de  $\text{mg/kg}$ ). Además de la susceptibilidad de las especies, también hay diferencias en las respuestas a LPS entre diferentes cepas de la misma especie. Por ejemplo, los ratones LBAB/c son muy sensibles a LPS, mientras que los ratones C57BL/6 son más resistentes.

El uso de LPS bacteriano tiene una serie de ventajas, como la facilidad de administración y la reproducibilidad en experimentos. El LPS es también un potente activador de la inmunidad innata mediada por las vías de TLR4 y tiene poca toxicidad sobre las células *in vitro*. Por lo tanto, el uso de LPS permite obtener información sobre los efectos de las respuestas inflamatorias del huésped frente a infecciones bacterianas. Sin embargo, el LPS tiene algunas desventajas significativas, por ejemplo, las preparaciones de LPS varían en pureza y pueden estar contaminadas con lipoproteínas u otros materiales bacterianos [Tapping et al., 2000]. En general, el tratamiento con LPS no causa la severa lesión endotelial y epitelial que se produce normalmente en los humanos con SDRA [Wiener-Kronish et al., 1991], dando una imagen incompleta de los efectos de las bacterias en los pulmones.

#### **1.6.2. Modelo de DPA inducido por ventilación mecánica (VILI)**

Durante los años 1980 y 1990, varios estudios han mostrado que la ventilación mecánica puede producir inflamación y daño pulmonar en animales, un evento denominado daño pulmonar inducido por ventilación (VILI) [Dos Santos and Slutsky, 2000; Dreyfuss and Saumon, 1998]. El mecanismo de VILI implica daño tisular directo debido a estiramiento mecánico y activación de vías específicas intracelulares implicadas en mecanotransducción [Vlahakis and Hubmayr, 2005]. El estiramiento excesivo de las paredes alveolares resulta en la ruptura endotelial y epitelial con formación de edema intersticial (Fu Z et al., 1992). La separación de las células endoteliales de la membrana basal y la muerte de las células epiteliales con consiguiente denudación de la membrana basal epitelial resulta evidente después de 20 minutos de ventilación mecánica con volúmenes corrientes ( $V_t$ ) muy altos [Dreyfuss et al., 1985]. Además, el desarrollo de membranas hialinas y una mayor permeabilidad, requieren la presencia de PMN, lo que sugiere que, además del daño mecánico, el daño inflamatorio es también necesario para que la ventilación mecánica induzca la lesión pulmonar [Kawano et al., 1987]. La deformación mecánica celular puede inducir la activación de la señalización inflamatoria con la consiguiente producción de citoquinas proinflamatorias y también cambios en el tráfico de lípidos, lo que podría representar un mecanismo para el mantenimiento de la integridad celular [Pugin et al., 1998; Vlahakis et al., 1999; Vlahakis et al., 2001].

La gravedad de la lesión pulmonar depende de la estrategia ventilatoria, en particular de los volúmenes corrientes utilizados. Los volúmenes corrientes elevados provocan hemorragia alveolar, formación de membranas hialinas, infiltración neutrofílica, disminución de la distensibilidad pulmonar y anomalías en el intercambio de gases. Por ejemplo, una ventilación mecánica con un volumen corriente de 10 ml/kg y FiO<sub>2</sub> de 0.21 no induce daño, pero la ventilación mecánica combinada con dosis bajas de LPS tiene un efecto sinérgico, resulta en alveolitis neutrofílica y aumento de la permeabilidad alveolar [Altemeier et al., 2004].

El modelo de VILI tiene ventajas y desventajas: la principal ventaja es su relevancia clínica, porque es el único modelo que ha llevado a cambios en la práctica clínica. La principal desventaja es la complejidad del modelo. De hecho, en los animales de pequeño tamaño como los ratones se produce daño en períodos de tiempo relativamente cortos, mientras que los pacientes requieren ventilación mecánica durante días o semanas.

### **1.6.3. Modelo de shock hemorrágico y traumático**

El trauma severo es la principal causa de muerte y discapacidad en todo el mundo [Lozano et al., 2012]. El choque hemorrágico que se produce después de una pérdida muy grave de sangre asociada a trauma resulta en un estado de isquemia tisular y se asocia con cambios en el perfil metabólico en plasma y orina [Kinross et al., 2011]. La mortalidad está directamente relacionada con la pérdida masiva de sangre o se produce indirectamente por fallo orgánico múltiple, debido a producción excesiva de ROS, respuesta inflamatoria sistémica, apoptosis y necrosis celular [Collard and Gelman, 2001; Rushing and Britt, 2008], eventos que llevan al desarrollo de SDRA. En particular, la pérdida de la función gastrointestinal, renal, hepática y pulmonar es frecuente después del choque hemorrágico [Badin et al., 2011; Fan, 2010; Hierholzer and Billiar, 2001]. Muchas evidencias sugieren que el aumento de la actividad de la iNOS está implicada en la patogénesis del daño intestinal mediado por isquemia-reperfusión [Szabo, 1995]. Actualmente, para el tratamiento no quirúrgico de choque hemorrágico, se recomienda una rápida reanimación mediante el uso de cristaloides para restaurar el volumen intravascular y el gasto cardíaco [Finfer et al., 2010; Rossaint et al., 2006]. Sin embargo, esta práctica es controvertida porque la restauración agresiva

del volumen intravascular con un rápido aumento en la presión sanguínea, antes de controlar la hemorragia, puede conducir a un aumento de la mortalidad [Hussmann et al., 2011]. Por lo tanto, se ha propuesto la reanimación controlada con líquidos en pequeños volúmenes antes de parar el sangrado [Barrantes et al., 2008]. De todas formas, es difícil encontrar un tratamiento para el choque hemorrágico grave que evite la interrupción del flujo sanguíneo hacia los órganos vitales [Sihler and Napolitano, 2010]. Para mejorar las estrategias existentes en la medicina de emergencia, las características de las posibles intervenciones terapéuticas para el choque hemorrágico severo tienen que ser estudiadas en un modelo animal eficaz, realista y reproducible. Se han establecido numerosos modelos animales destinados a simular y estudiar condiciones de choque hemorrágico [Chang and Varma, 1992; Eser et al., 2007; Lomas-Niera et al., 2005; Mochhala et al., 2009; Sato et al., 2010]. En vista de la reproducibilidad y fiabilidad experimental, los modelos en los que se fija la presión arterial son superiores a los de volumen fijo. En modelos animales de presión fija, el choque hemorrágico se realiza mediante la extracción de sangre hasta que la presión arterial deseada sea alcanzada; durante el período de choque, la presión de la sangre es mantenida en este valor a través de otra extracción o reinfusión de sangre u otros fluidos. El volumen de sangre circulante de los mamíferos no se correlaciona estrictamente con el peso corporal y no aumenta linealmente con el aumento del peso del cuerpo, debido a las diferencias individuales en la relación de volumen de sangre/masa de tejido adiposo y muscular. Por ejemplo, los animales más pesados suelen tener más grasa y comparativamente menos sangre. Por lo tanto, a diferencia de los modelos de presión fija, los modelos de volumen fijo (que se basan en el peso corporal) producen disminuciones variables en la presión arterial media (PAM) y así, en la intensidad del choque hemorrágico. En los modelos de presión fija, la presión aunque sea ajustada, se mantiene todavía alta (35 mmHg o más) [Halvorsen et al., 1991; Molina et al., 2009] y, por lo tanto, el daño tisular inducido por choque es más leve o la duración del período de choque es muy breve [Chang and Varma, 1992; Eser et al., 2007] o demasiado largo [Halvorsen et al., 1991; Sato et al., 2010], no reflejando las situaciones reales de choque de 45-60 minutos. En otros estudios basados sobre el uso de modelos de presión fija, se toleran variaciones sustanciales en la PAM durante el choque [Lee et al., 2008] o los animales no se rescatan [Sato et al., 2010], una práctica que es razonable solo para modelos de daño muy leve y que excluye la posibilidad de estudiar los regímenes de reanimación para el choque hemorrágico agudo. En resumen,

la isquemia pulmonar seguida de reperfusión resulta en daño pulmonar caracterizado por aumento de la permeabilidad vascular y edema, de la infiltración de PMN y por hemorragia. El modelo de choque hemorrágico representa un modelo severo pero reproducible y realista. Tal modelo permite una evaluación fiable de parámetros como la supervivencia, la actividad de enzimas marcadores en plasma y las alteraciones histopatológicas. A pesar de las limitaciones de los estudios en animales, el modelo de choque puede reflejar la práctica actual del tratamiento, después de un trauma grave y una pérdida de sangre en pacientes.

## **2. ESFINGOLÍPIDOS**

Las células eucariotas están rodeadas por una membrana cuya base estructural es una bicapa lipídica que está formada por tres clases de lípidos: los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos y los esteroides [Futerman and Hannun, 2004]. Las propiedades bioquímicas y biofísicas de los mismos varían considerablemente e impactan en forma diferente en la función celular. Los esfingolípidos fueron así denominados por J.L.W. Thudichum, inspirado en las esfinges (Sphinx) de la mitología griega y así llamó a los compuestos que había aislado en el año 1884, debido precisamente a la naturaleza enigmática de sus funciones. Inicialmente los esfingolípidos estaban reconocidos principalmente como elementos estructurales de la membrana biológica, pero se ha descrito ampliamente en los últimos años su papel en la regulación de procesos clave para la funcionalidad celular. Dada la gran variedad de los esfingolípidos tanto desde el punto de vista estructural como funcional, el estudio de estos compuestos se ha convertido en un tema de gran interés.

### **2.1. Estructura y función**

Como todos los lípidos de membranas, los esfingolípidos son moléculas anfipáticas que tienen propiedades hidrofóbicas y también hidrofílicas. La región hidrofóbica consiste en una base esfingoidea de larga cadena (normalmente esfingosina, fitoesfingosina, esfinganina) al que se une un ácido graso de longitud variable en posición C-2. La región hidrofílica varía según el tipo de esfingolípido, por ejemplo fosfato en el caso de esfingosina-1-P (S1P) y de ceramida-1-P (C1P), fosforilcolina en la esfingomielina y residuos de azúcar en los glicoesfingolípidos, mientras que la ceramida, que es el esfingolípido más simple, tiene una región hidrofílica mínima que consta de dos grupos -OH. Se conocen cinco bases esfingoideas diferentes en las células de mamífero, más de 20 especies de ácidos grasos (que varían en la longitud, el grado de saturación y de hidroxilación) pueden unirse a la base esfingoidea y alrededor de 500 carbohidratos diferentes se han descrito en los glicoesfingolípidos, lo que refleja la gran variedad de la familia de los esfingolípidos [Futerman and Hannun, 2004]. Aparte de su papel estructural como componentes de las membranas, los esfingolípidos regulan la dinámica de éstas y forman parte de los microdominios de membrana denominados balsas lipídicas de membrana (*“lipid rafts”*) que tienen propiedades y funcionalidad propias.

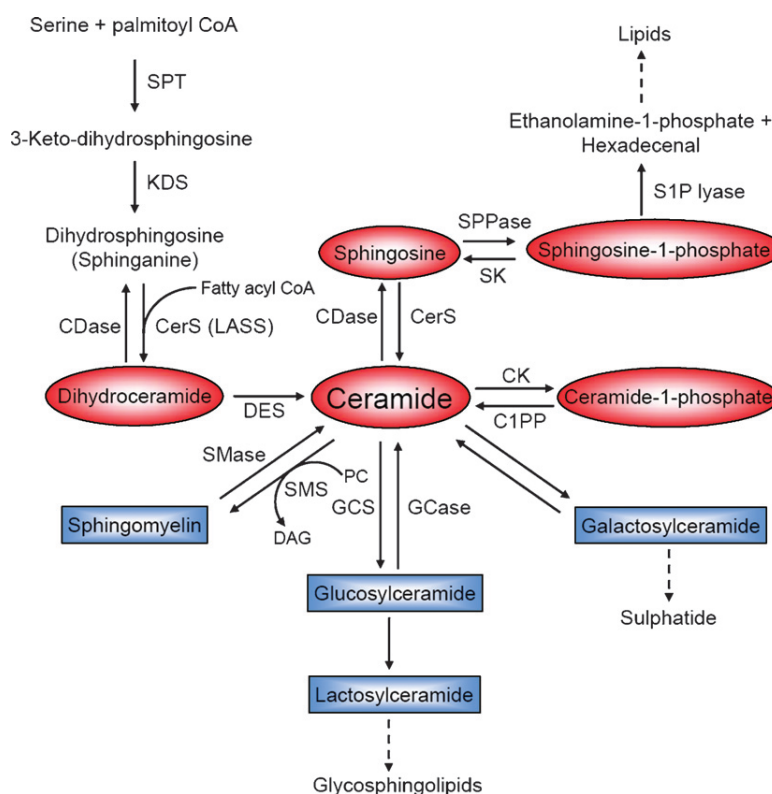
También regulan procesos celulares como la diferenciación, el crecimiento, la apoptosis, la inmunidad innata y adquirida, la permeabilidad vascular y el tono del músculo liso [Uhlíg and Gulbins, 2008]. Cada vez más, los esfingolípidos se están revelando como elementos clave en distintas cascadas de transducción de señales. Por otro lado, algunos esfingolípidos actúan como receptores en la infección de patógenos [Hanada, 2005; Sandvig et al., 2004] o como antígenos en la respuesta inmune [Schwerer, 2002; Yuki, 2001]. Por último, los esfingolípidos contribuyen a diferentes condiciones patológicas como el edema pulmonar, el enfisema, la fibrosis quística o la neumonía [Uhlíg and Gulbins, 2008].

## 2.2. Metabolismo

La vía metabólica de los esfingolípidos representa una compleja red de reacciones que resulta en la formación de una multitud de esfingolípidos. Los elementos centrales de su biosíntesis y catabolismo son la ceramida (Cer) y la dihidroceramida (dhCer) (figura 5). La ceramida puede originarse por dos mecanismos diferentes, que son la síntesis *de novo* y la hidrólisis del complejo lipídico, especialmente de la esfingomielina (SM) [Bartke and Hannun, 2009]. La síntesis *de novo* empieza con la condensación de la serina y del palmitoil-CoA por la enzima serina palmitoil transferasa (SPT) para formar la 3-ceto-dihidroesfingosina. Posteriormente la 3-ceto-dihidroesfingosina es reducida a dihidroesfingosina (esfinganina), que es N-acetilada por acción de las dhCer sintasas para producir dhCer o ceramida [Mandon et al., 1992]. A continuación, la dhCer puede ser desaturada por la dhCer desaturasa, dando origen a la ceramida [Michel et al., 1997a]. En las reacciones siguientes la ceramida es principalmente usada para la síntesis de la SM, mediante la transferencia del grupo de cabeza fosfocolina de la fosfatidilcolina a la ceramida en una reacción catalizada por las enzimas SM sintasas, produciendo también diacilglicerol [Tafesse et al., 2006]. En segundo lugar la ceramida puede ser fosforilada por la ceramida quinasa y luego ser reciclada por la acción de la enzima C1P fosfatasa [Shinghal et al., 1993] o glicosilada por la glucosil o galactosil ceramida sintasas [Ichikawa and Hirabayashi, 1998]. En la vía metabólica hidrolítica, la esfingomielina es degradada por acción de las esfingomielinasas (SMasas) que resulta en la liberación de ceramida y fosfocolina. Otra fuente de ceramida deriva de la degradación de los glicoesfingolípidos a través de la hidrólisis secuencial de las porciones hidrofílicas terminales por parte de las enzimas hidrolasas. Los productos



glucosilceramida y galactoceramida son ulteriormente hidrolizados a ceramida por las  $\beta$ -glucosidasas y galactosidasas [Tettamanti, 2004]. La ceramida es metabolizada por las ceramidasa (CDasas), que eliminan el residuo de acil graso, unido mediante un enlace amida, para formar la esfingosina (Sph). Se han identificado tres tipos de CDasas según el pH óptimo y la localización subcelular: CDasa ácida, CDasa neutra/alcalina y CDasa alcalina [Mao and Obeid, 2008]. La Sph está disponible para el reciclaje en la vía de los esfingolípidos o para la fosforilación por parte de una de las Sph quinasas, SK1 y SK2, que dan origen a la Sph-1-fosfato (S1P) [Hait et al., 2006]. Además las S1P fosfatasas pueden defosforilar S1P, regenerando Sph [Johnson et al., 2003]. Por último, la S1P liasa puede metabolizar S1P para liberar etanolamina fosfato y hexadecenal, que posteriormente reducidos a palmitato, pueden ser incorporados nuevamente en la vía metabólica lipídica [Bandhuvula and Saba, 2007].

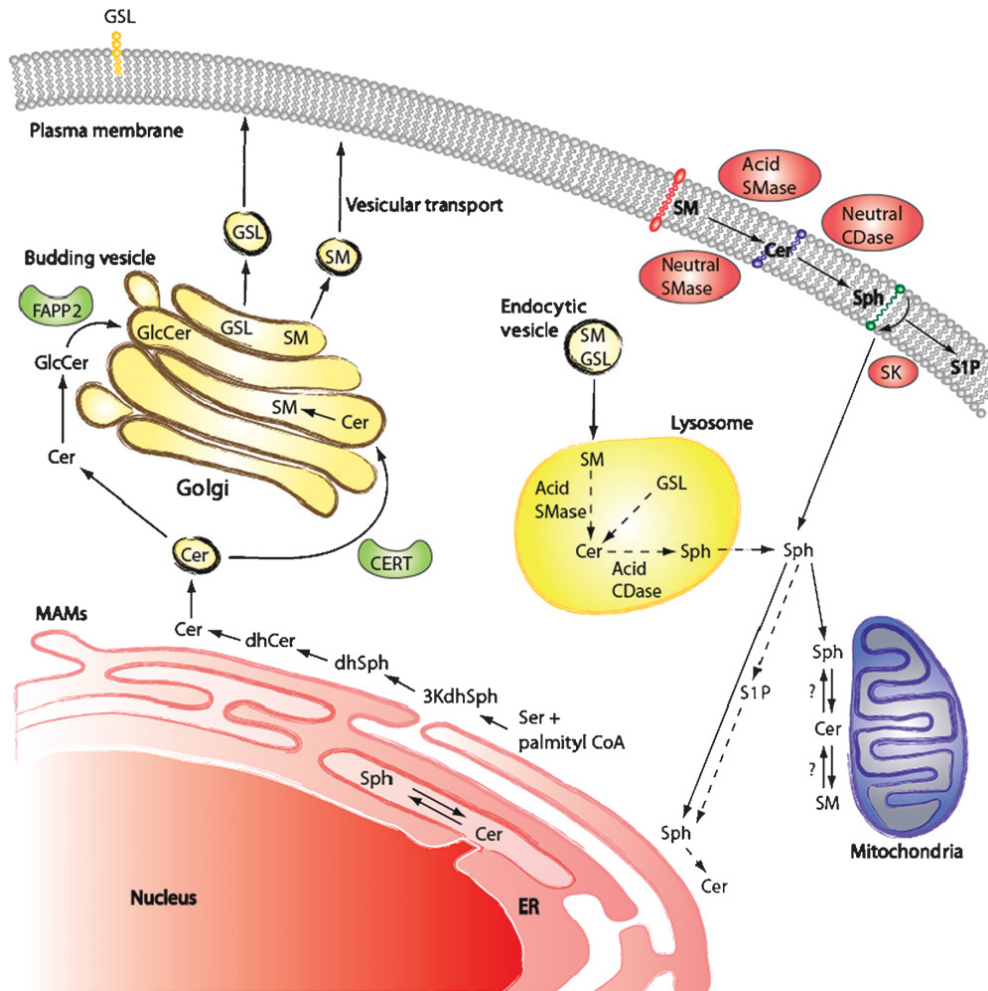


**Figura 5.** Esquema del metabolismo de los esfingolípidos. Tomado de Bartke N, Hannun YA, 2009.

### 2.3. Compartimentalización y regulación de los esfingolípidos bioactivos

Las reacciones enzimáticas implicadas en el metabolismo de los esfingolípidos se producen en diferentes compartimentos celulares (figura 6). Las etapas iniciales de la síntesis *de novo* de los esfingolípidos que dan origen a la ceramida tienen lugar en la superficie citosólica del retículo endoplasmático (RE) y potencialmente en las membranas asociadas al RE como la membrana perinuclear y la membrana asociada a las mitocondrias [Michel and van Echten-Deckert, 1997]. La síntesis de metabolitos de los esfingolípidos más complejos como SM y glucosilceramida (GlcCer) ocurre en el aparato de Golgi. Hay dos vías específicas para el transporte de la ceramida desde el RE hacia el complejo de Golgi: transporte vesicular (implicado en la formación de GlcCer) o mediado por la proteína transportadora de ceramida (CERT) en un proceso dependiente de ATP (implicado en la síntesis de la SM). Posteriormente, la proteína de transporte FAPP2 (la proteína adaptadora de cuatro fosfato 2) libera GlcCer como precursor para la síntesis de los glicosfingolípidos (GSLs) [Yamaji et al., 2008]. La síntesis del complejo de los GSLs (por ejemplo los gangliósidos) ocurre en el lumen del Golgi. Por lo tanto la GlcCer tiene que ser transportada de forma inversa para pasar de la superficie citosólica al Golgi. Este mecanismo es facilitado por la glicoproteína P, un transportador ABC (del inglés ATP binding cassette), conocido también como MDR1 [Lannert et al., 1998]. En segundo lugar la SM y el complejo de los GSLs son transportados hacia la membrana plasmática mediante transporte vesicular y la SM puede ser metabolizada a ceramida a través de la aSMasa en la parte más externa de la membrana o de la nSMasa en la parte más interna de la membrana. Desde la membrana plasmática los esfingolípidos pueden ser redistribuidos mediante la vía endosomal: SM y GlcCer son metabolizadas a ceramida en el compartimento lisosomal por acción de las SMasas y glucosidasas y, la ceramida es posteriormente degradada por la CDasa para formar Sph [Bartke and Hannun, 2009]. Debido a su carga positiva, la Sph es capaz de dejar el lisosoma y tiene una adecuada solubilidad en el citosol que le permite moverse entre las membranas, incluso en el RE [Riboni et al., 1998]. En conclusión, la localización subcelular de las enzimas del metabolismo de los esfingolípidos es una clave importante que determina el sitio de acción de los mismos esfingolípidos bioactivos. Puesto que estos compuestos tienen partes hidrofóbicas e hidrofílicas, es evidente que se trata de componentes integrales de membrana biológica que pueden mostrar pequeños movimientos dentro la misma capa lipídica (difusión lateral, rotación o

flexión) o de una monocapa a la otra gracias a las enzimas flipasas (movimientos “flip flop”). Existen además mecanismos de transporte específico de esfingolípido (CERT o FAPP2) [Bartke and Hannun, 2009].



**Figura 6.** Compartimentalización de los metabolitos y de las enzimas de la vía de los esfingolípidos. Tomado de Bartke N, Hannun YA, 2009.

## 2.4. Microdominios de membrana

Las membranas celulares muestran un alto grado de organización y los esfingolípidos son responsables de su estructura y rigidez. Además de los esfingolípidos, las membranas celulares se componen fundamentalmente de colesterol y glicerofosfolípidos. Los grupos que forman la cabeza polar de los esfingolípidos interactúan unos con otros y con el grupo hidroxilo de la molécula de colesterol a través

de interacciones hidrófilas, mientras que las cadenas alquílicas y el sistema de anillos del colesterol exhiben interacciones hidrofóbicas de tipo de van der Waals [Brown and London, 1998]. Las moléculas de colesterol parecen llenar los huecos entre los esfingolípidos y promover así la estructura de estos dominios [Simons and Ikonen, 1997]. De esta forma, las interacciones estrechas dan lugar a una separación de los esfingolípidos y colesterol de los otros fosfolípidos en la membrana celular y a la formación de distintos dominios muy pequeños en la membrana celular, enriquecidos en esfingolípidos y colesterol [Brown and London, 1998; Kolesnick et al., 2000], que se denominan balsas lipídicas (*“lipid rafts”*). La generación de ceramida en las balsas de lípidos por acción de las esfingomielinasas, se ha demostrado que da lugar a la formación de plataformas, dominios de membrana más grandes [Gulbins et al., 2004; Gulbins and Kolesnick, 2003; Liu and Anderson, 1995]. En general, las balsas sirven como puntos de anclaje del citoesqueleto o como lugares de agregación y oligomerización para diferentes receptores como se ha demostrado para CD95, DR5 o CD40 [Dumitru and Gulbins, 2006; Grassme et al., 2001; Grassme et al., 2002] que permiten el inicio de las cascadas de señalización, regulando directamente moléculas como la catepsina D [Heinrich et al., 1999], la fosfolipasa A2 [Huwiler et al., 2001], la proteína quinasa C [Muller et al., 1995] y como lugares para la captación de los microorganismos [Esen et al., 2001; Grassme et al., 1997; Grassme et al., 2003]. Las balsas de lípidos son también esenciales para la transducción de señalización mediada por los receptores de inmunidad innata TLR. TLR-4 y otros miembros del complejo LPS-receptor como el CD14 deben ser colocados en regiones de balsas lipídicas para que la señalización inducida por el LPS sea eficiente. Sin embargo, los efectos de la ceramida en los procesos inflamatorios muestran alta variabilidad. Así, la ceramida se ha demostrado que inhibe los efectos del LPS sobre la óxido nítrico sintasa inducible (NOS2) y sobre la expresión de la ciclooxygenasa 2 [Hsu et al., 2001; Koide et al., 2003], mientras que en otros estudios, se ha demostrado que es capaz de potenciar la expresión de estas moléculas [Pahan et al., 1998; Won et al., 2004]. Las balsas de membrana enriquecidas en ceramida parecen también estar implicadas en la regulación de canales iónicos como Kv 1.5 [Cogolludo et al., 2006; McEwen et al., 2008] y en la formación de poros en la membrana mitocondrial externa [Siskind et al., 2002] que podrían ser importantes para la inducción de apoptosis. Las caveolas son una forma particular de balsa lipídica y su principal componente es la caveolina-1. En los pulmones, las caveolas son particularmente abundantes en las células endoteliales, en células

alveolares de tipo II, en los fibroblastos y en las células de músculo liso [Parton and Simons, 2007; Predescu et al., 2007].

## **2.5. Esfingolípidos y vías de señalización**

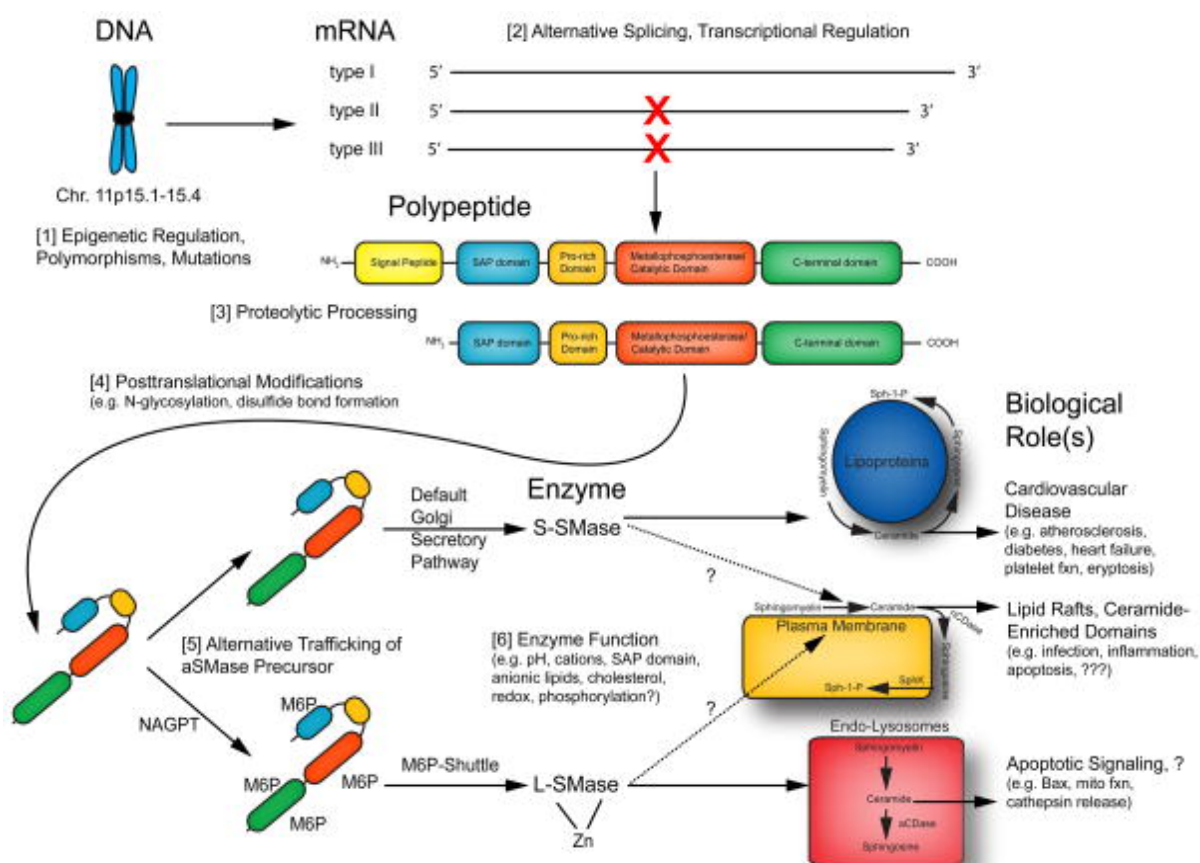
### **2.5.1. Las esfingomielinasas**

La hidrólisis de la esfingomielina a ceramida y fosfocolina es catalizada por diferentes isoenzimas esfingomielinasas que se diferencian en base a su pH óptimo, localización subcelular o dependencia de cationes: la SMasa ácida presente en los lisosomas, una forma secretada y soluble de SMasa ácida dependiente de zinc, la SMasa neutra dependiente de magnesio y unida a la membrana, una SMasa neutra independiente de magnesio y una SMasa alcalina [Andrieu-Abadie et al., 2001; Goni and Alonso, 2002; Levade et al., 1999; Levade and Jaffrezou, 1999; Marchesini and Hannun, 2004].

#### **2.5.1.1. La esfingomielinasa ácida (aSMasa)**

El gen codificante para la aSMasa es el SMPD1 que se encuentra en el cromosoma 11p15.1-11p15.4 humano y puede dar lugar a tres ARNm por procesamiento post-transcripcional (“*splicing*”), pero solo el transcrito de tipo 1 da origen a la enzima funcional (Schuchman EH et al., 1991). El ADNc completo genera un polipéptido de 629 aminoácidos [Quintern et al., 1989; Schuchman et al., 1991] que representa la proteína precursora y que, según su compartimentación, puede dar lugar a dos formas de aSMasa, una aSMasa que se localiza en los lisosomas, y que es la más estudiada, y una forma secretada que es liberada a nivel extracelular [Schissel et al., 1996]. La existencia de dos formas puede servir para controlar diferentes procesos metabólicos y así el efecto biológico de la hidrólisis de la esfingomielina a ceramida puede depender de su compartimentación [Jenkins et al., 2009]. La aSMasa de ratón tiene un 82% de identidad con la humana y se localiza a nivel del cromosoma 7. El análisis de la region anterior (upstream) del gen revela la presencia de zonas ricas en GC y muchos elementos potencialmente promotores, incluyendo secuencias consenso de unión para algunos factores de transcripción como AP-1 y Sp1 que inducen la activación de genes en respuesta a estímulos inflamatorios, inmunológicos o de estrés [Schuchman et al., 1991]. La estimulación del promotor de la aSMasa se ha encontrado en muchas

situaciones, como en la diferenciación inducida por ácido transretinoico (ATRA) de las células leucémicas [Murate et al., 2002], la diferenciación de los monocitos a macrófagos [Langmann et al., 1999], en los fibroblastos procedentes de pacientes con el síndrome de Werner [Lecka-Czernik et al., 1996] y en modelos de obesidad en ratón inducida genéticamente y por dieta [Samad et al., 2006; Shah et al., 2008]. La SMPD1 está también sujeta a regulación epigenética mediante metilación [Simonaro et al., 2006]. La capacidad de la aSMasa de desarrollar sus funciones metabólicas es debida a múltiples niveles de regulación celular que necesitan una adecuada transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, transporte y compartimentación que den origen a la enzima madura y funcional (figura 7). Además de la síntesis y del transporte, la actividad enzimática de la aSMasa puede ser modulada por lípidos, cationes, pH, agentes oxidantes y otras proteínas [Jenkins et al., 2009].



**Figura 7.** Esquema de la aSMasa: desde el gen a la enzima funcional. Tomado de Jenkins RW et al., 2009.

Al igual que las otras enzimas del endolisosoma, la aSMasa tiene una secuencia señal para el retículo endoplasmático a nivel del extremo N terminal, que es suficiente para la introducción del polipéptido precursor en el RE. En el RE, el precursor de la aSMasa comienza un proceso de maduración común a todas las proteínas de la vía secretora. La expresión de un mutante de la aSMasa humana que carece del péptido señal resulta en la producción de una proteína no glicosilada, de localización citosólica que no tiene actividad enzimática en extractos celulares, y que no es secretada [Ferlinz et al., 1994]. Por otra parte, la secuencia señal es una región polimórfica, razón por la cual podría ser poco probable que influya en la actividad catalítica en sí misma. La aSMasa es altamente sensible a los agentes reductores [Liu and Hannun, 1997] y probablemente su inactivación implica la reducción de los puentes disulfuro y la oxidación o deleción del residuo de cisteína 629 que resulta en el aumento de la actividad de la aSMasa [Qiu et al., 2003]. Otro tipo de modificación post-traducciona que puede sufrir la aSMasa es la nitrógeno-glicosilación a nivel de los residuos de asparagina (Asn86, Asn175, Asn335, Asn395 y Asn520). La mutación del residuo Asn520 lleva a una producción reducida de la forma secretada de la aSMasa y a una pérdida completa de función de la aSMasa de los lisosomas, presumiblemente por una incorrecta compartimentación [Ferlinz et al., 1997]. Esta glicosilación podría también servir como protección para prevenir la posible destrucción en el entorno hostil del lisosoma [Newrzella and Stoffel, 1996] o para mantener la enzima madura en una conformación activa [Bartelsen et al., 1998]. Por último, otro mecanismo de compartimentación de la aSMasa de los lisosomas está mediado por la vía del receptor de la manosa-6-fosfato [Ni and Morales, 2006].

Por otra parte, se ha descrito que la forma secretada de la aSMasa es una fosfoproteína en virtud de la posible incorporación del fosfato en las estructuras de oligosacáridos (por ejemplo, la manosa-6-fosfato) [Hurwitz et al., 1994b] o en la cadena principal del polipéptido [Ferlinz et al., 1997]. Recientemente, Zeidan y sus colaboradores han publicado una serie de estudios que demuestran que la aSMasa puede ser fosforilada a nivel de la serina 508 por la proteína quinasa citosólica C delta (PKC  $\delta$ ), y que esta fosforilación parece ser necesaria para la activación y la relocalización de la enzima a la membrana plasmática [Zeidan and Hannun, 2007; Zeidan et al., 2008a; Zeidan et al., 2008b]. Otros grupos han analizado diferentes mutaciones a nivel de la porción carboxilo-terminal (aminoácidos 462-629) de la aSMasa, demostrando que tal extremo es crucial para la estructura de la proteína, que a su vez determina la función enzimática y la secreción [Lee et al., 2007].

La aSMasa también es objeto de procesamiento proteolítico. Poco después de la entrada en el RE, una peptidasa elimina la secuencia señal del RE a nivel del extremo N-terminal (aminoácidos 1-46) y probablemente unos pocos residuos adicionales. Muchos estudios evidencian la presencia de múltiples etapas de procesamiento proteolítico y se presentan varias teorías sobre la forma madura de la aSMasa. Según algunos autores el procesamiento de la pre-pro-forma inicial de la aSMasa de 75 kDa a la pro-forma de 72 kDa se produce dentro de 2-3 horas, mientras que la formación de la forma madura de 70 kDa se obtiene después de 4-8 horas [Jenkins et al., 2009]. Por último, se ha observado que la forma de 70 kDa se pierde tras el tratamiento con desipramina, lo que sugiere que esta forma representa la enzima madura [Hurwitz et al., 1994a]. Estudios de biosíntesis de la aSMasa en fibroblastos humanos [Hurwitz et al., 1994b] y en células COS-1 transfectadas [Ferlinz et al., 1994] muestran que la forma madura de la enzima lisosomal es la de 70 kDa, aunque en el aparato de Golgi y en los lisosomas se detecten formas más pequeñas también. De hecho, el grupo de Kusada ha encontrado como forma activa, una de 58 kDa a nivel de tejido cutáneo [Kusuda et al., 1998] y otros estudios han demostrado la presencia de formas de 57 y 52 kDa [Ferlinz et al., 1997; Hurwitz et al., 1994b]. Además, otras evidencias sugieren que a partir del pro-precursor de 75 kDa se generan dos formas de aSMasa: una forma lisosomal activa de 70 kDa y una forma de 57 kDa a nivel de RE y Golgi, que pero tiene menos actividad enzimática [Ferlinz et al., 1994; Hurwitz et al., 1994b]. Por el contrario, Edelmann y sus colaboradores sugieren que la forma madura corresponde a la de 57 kDa, que presenta una mayor actividad enzimática respecto a las de 75/72 kDa [Edelmann et al., 2011].

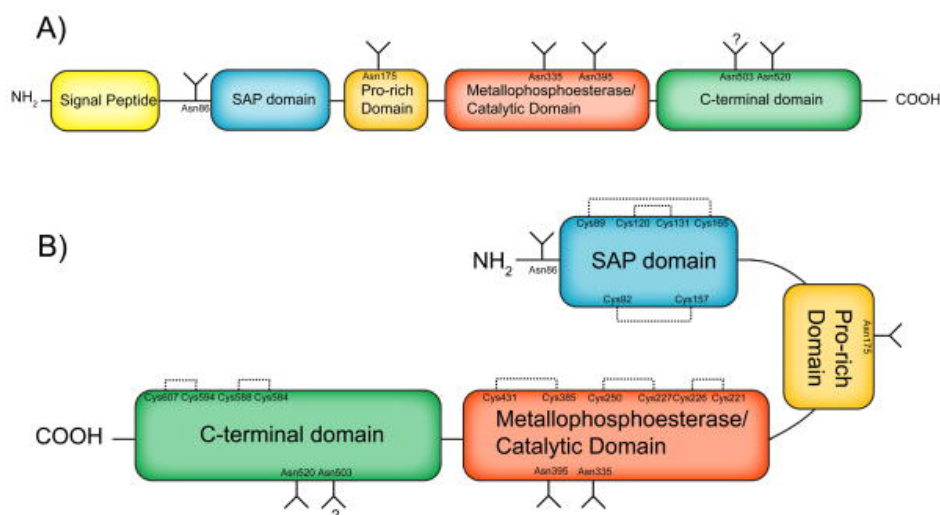
Una vez maduras las formas secretada y lisosomal, se dirigen hacia sus respectivos destinos intra o extracelulares. La actividad de ambos puede ser influenciada por el pH, el requerimiento de cationes, la presencia del dominio de unión para las proteínas activadoras de los esfingolípidos (saposin-like domain, SAP domain) y la unión con lípidos activadores o inhibidores.

Usando la aSMasa lisosomal purificada a partir de la placenta humana, Callahan y colaboradores deducen que el pH ácido (4.5-5.5) es un requisito importante para la correcta función de la enzima y lo que más afecta es a su afinidad de unión al sustrato ( $K_m$ ) y no a su velocidad catalítica ( $V_{max}$ ) [Callahan et al., 1983]. Mientras que la SMasa lisosomal parece ser capaz de funcionar en condiciones de pH bajo en los compartimentos de los lisosomas, la forma secretada puede participar en la hidrólisis de



la esfingomielina también en condiciones de pH neutro en el medio extracelular o en asociación con lipoproteínas en el suero.

Tanto la forma secretada como la lisosomal son metaloenzimas de zinc (Zn). La aSMasa de los lisosomas se une estrechamente al Zn durante su maduración y por lo tanto la disponibilidad de Zn o factores que regulen el Zn son importantes mediadores de la actividad de tal enzima. Para la aSMasa secretada, el requisito de cationes para la actividad enzimática es menos conocido [Bartelsen et al., 1998; Qiu et al., 2003]. La estructura primaria del extremo N-terminal de la aSMasa tiene un dominio llamado “saposin-like domain” (SAP-domain), que se extiende después de la secuencia señal (aminoácidos 89 a 165) [Ponting, 1994]. Este dominio tiene motivos permutados parecidos a los dominios específicos para las saposinas, que son proteínas presentes predominantemente en el compartimento ácido y que facilitan la degradación de los esfingolípidos [Kolter and Sandhoff, 2005]. Se ha sugerido que el dominio SAP podría funcionar como una región intramolecular activadora para la hidrólisis de la SM, gracias al dominio rico en prolina que sirve como región de unión entre este y el sitio catalítico (figura 8). Mutaciones en los residuos conservados de este dominio resultan en la alteración de la actividad de la aSMasa de los lisosomas, lo que puede o no ser rescatado por administraciones exógenas de SAP [Jenkins et al., 2009], sugiriendo que tal dominio pueda tener otras funciones también.



**Figura 8.** Estructura de la aSMasa. A) Estructura primaria del polipéptido; B) Conformación estilizada de la enzima madura. Tomado de Jenkins RW et al., 2009.

Teniendo en cuenta que el sustrato de la aSMasa reside en las membranas biológicas y que la aSMasa es una enzima soluble, parece probable que la interacción con los lípidos

vecinos podría servir como un mecanismo para regular la función de la enzima. De hecho, estudios recientes revelan que el bis-monoacilglicerofosfato (BMP) y el fosfatidilinositol (PI) incrementan la hidrólisis de la SM por la aSMasa humana recombinante (rh-aSMasa) [Linke et al., 2001], mientras que los derivados fosforilados del PI (por ejemplo, PI-3,5-P2 y PI-3,4,5-P3) actúan como inhibidores *in vitro* [Kolzer et al., 2003; Testai et al., 2004]. Así, la presencia (o ausencia) de diferentes inhibidores o activadores lipídicos puede limitar la función de la aSMasa en ciertos compartimentos (por ejemplo, PI-3,4,5-P3 en la membrana plasmática) o promover su acción en otros (por ejemplo, el aumento de BMP en el lisosoma). Estudios previos en células [Kolesnick, 1987] muestran también que el 1,2- diacilglicerol (DAG) aumenta los niveles de ceramida, posiblemente mediante la activación de aSMasa. Recientemente, el grupo de Matsumoto ha demostrado que el NO induce una interacción entre la pro-caspasa 3 y la aSMasa, que inhibe la activación de la pro-caspasa 3, una proteasa implicada en la ejecución del proceso apoptótico [Matsumoto et al., 2003]. Estos resultados podrían apoyar estudios anteriores que sugieren una estrecha relación entre las vías de NO y de ceramida [Igarashi et al., 1999]. De hecho, Clementi y sus colaboradores han observado que el NO exógeno en las células U937 [De Nadai et al., 2000] y el NO endógeno generado en la línea celular HeLa Tet-off [Bulotta et al., 2001] regulan el proceso de apoptosis inducido por TNF- $\alpha$  a través de una vía que implica la acumulación de ceramida. Por último, un gran número de estudios han demostrado que los inhibidores de la caspasa reducen la activación de la aSMasa inducida por TNF o CD95 [Brenner et al., 1998] y que la sobreexpresión de la caspasa-8 o FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) resulta en el aumento de la ceramida después de la señal generada por CD95 [Grulich et al., 2000]. Estos resultados están apoyados por estudios recientes en células de glioma que sugieren que la activación de la aSMasa inducida por Fas es inhibida por z-IEDT-fmk, un inhibidor de la caspasa-8 [Sawada et al., 2002]. Por otro lado Schwandner demuestra que ni la caspasa-8 ni un mutante negativo de la caspasa-8 afectan la activación de la aSMasa inducida por TNF- $\alpha$  [Schwandner et al., 1998]. Sin embargo, se desconoce cual es la forma que está implicada en este evento y si la interacción se produce a nivel de membrana plasmática. La ausencia de la aSMasa da lugar a la enfermedad de Niemann-Pick.

### 2.5.1.2. La esfingomielina neutra (nSMasa)

La esfingomielinasa neutra se produce a partir de un gen diferente de la aSMasa. Su actividad depende de cationes como magnesio ( $Mg^{2+}$ ) y manganeso ( $Mn^{2+}$ ) y es significativamente estimulada por los lípidos aniónicos, especialmente fosfatidilserina. El pH óptimo para la actividad de la nSMasa es alrededor de 7.4. Las actividades de la esfingomielinasa neutra se han descrito tanto en tejidos de mamíferos como en líneas celulares [Levade and Jaffrezou, 1999; Liu and Hannun, 1997]. La más conocida, la nSMasa dependiente de magnesio y unida a la membrana (nSMasa2, SMPD3), se encuentra predominantemente en el cerebro y en otros tejidos [Das et al., 1984; Liu et al., 1998; Tomiuk et al., 1998]. La actividad de estas enzimas parece estar implicada en la generación de ceramida inducida por el estrés y por la apoptosis [Liu and Hannun, 1997; Wiegmann et al., 1994]. La nSMasa1 (SMPD2) es  $Mg^{2+}$ -dependiente, se localiza en el retículo endoplasmático y es reversiblemente inhibida por el glutatión oxidado, pero su función sigue estando mal definida; se ha sugerido que este tipo de nSMasa pueda actuar principalmente como una fosfolipasa C (PLC) específica para el intermedio liso-PAF. La nSMasa2 (SMPD3) se expresa en el aparato de Golgi, pero probablemente también en la membrana plasmática y parece ser la principal isoenzima nSMasa que se activa por estrés oxidativo [Castillo et al., 2007; Goldkorn et al., 2005; Marchesini and Hannun, 2004]. Recientemente, se ha observado que la nSMasa3 (SMPD4) se expresa en niveles elevados no solo en el corazón, sino también en los pulmones y en otros órganos [Krut et al., 2006].

### 2.5.2. Ceramida y ceramida-1-fosfato (C1P)

La ceramida y la esfingosina-1-P (S1P) son los esfingolípidos bioactivos más importantes. La ceramida es producida en respuesta a varios estímulos entre los cuales destacan situaciones de estrés celular (como la isquemia, la radiación ultravioleta, el estrés oxidativo, los agentes quimioterapéuticos o la hipoxia/reperfusión) [Chang et al., 1995; Haimovitz-Friedman et al., 1997; Hannun and Obeid, 2002; Hernandez et al., 2000; Obeid et al., 1993; Senchenkov et al., 2001; Wright et al., 1996] y es inducida también por mediadores proinflamatorios como el LPS, el TNF- $\alpha$ , la IL-1 y el PAF [Goggel et al., 2004; Lang et al., 2005; Mathias et al., 1993; Schutze et al., 1992]. Muchas evidencias muestran que la ceramida es un mediador implicado en la regulación

de diferentes procesos celulares como el crecimiento, la diferenciación [Okazaki et al., 1989], la senescencia [Venable et al., 1995], la necrosis [Hetz et al., 2002], la proliferación [Adam et al., 2002] y la apoptosis [Obeid et al., 1993]. En lo que se refiere a la estructura, la ceramida se compone de un ácido graso unido mediante un enlace amida a una esfingosina y un alcohol insaturado de 18 carbonos (figura 9).



**Figura 9.** Estructura de la ceramida.

Los diferentes tipos de ceramida se diferencian por el grado de saturación, por la longitud de la cadena de ácido graso y por la  $\alpha$ -hidroxilación de los ácidos grasos unidos al nitrógeno. Estas especies de ceramida pueden residir de manera preferencial en distintas localizaciones subcelulares, que pueden relacionarse con enzimas específicas implicadas en su metabolismo y localizadas en la parte intracelular. Además, las distintas ceramidas se forman por acción de diferentes isoenzimas esfingomielinasas [Marchesini and Hannun, 2004] y pueden participar en varias vías de señalización reguladoras y respuestas celulares [Hannun and Obeid, 2002; Kolesnick et al., 2000; Riboni et al., 1997]. La ceramida puede ejercer sus acciones mediante la alteración de las propiedades físicas de la membrana (microdominios de membrana ricos en ceramida) y/o la interacción específica con dianas intracelulares como las proteínas fosfatasa, fosfolipasas A2 (PLA2), la catepsina D, que parece medie la acción de la ceramida producida en los lisosomas [Heinrich et al., 1999] o los canales iónicos. Ejemplos de fosfatasas activadas por la ceramida son la PP1, PP2A y PP2C [Canals et al., 2012; Saddoughi et al., 2013]. PP2A se encuentra en un complejo asociada con SET (también conocido como I2PP2A) que inhibe la función de PP2A. La ceramida se une a SET, demostrando sus acciones inhibitorias [Saddoughi et al., 2013]. La activación de

PPA2 que induce la defosforilación de Akt, un potente promotor de la supervivencia celular, podría, en parte, explicar las acciones proapoptóticas de la ceramida. Además, PP1 podría ser la diana de la ceramida generada a nivel de la membrana plasmática [Canals et al., 2012]. La catepsina D fue identificada por el grupo de Heinrich como una posible proteasa de unión a la ceramida [Heinrich et al., 1999]. La interacción de la ceramida con las catepsinas D induce la proteólisis autocatalítica de la proenzima de 52 kDa que genera la forma activa de 48/32 kDa, implicada en la activación proteolítica de las proteínas que se secretan (Henderson et al. 1993). La catepsina D ha sido recientemente implicada también en la mediación de la apoptosis en respuesta a TNF- $\alpha$ , el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), CD95 y los agentes quimioterapéuticos [Deiss et al., 1996; Wu et al., 1998]. Estos estudios pueden vincular la aSMase y la ceramida a la catepsina D, y por lo tanto a la vía secretora y a los eventos de señalización de apoptosis. Se ha observado también que la ceramida puede regular la proteína quinasa C (PKC)  $\zeta$  [Wang et al., 2005], raf-1 [Blazquez et al., 2000] y la quinasa represora de Ras [Ruvolo, 2003]. La estimulación de la proteína quinasa atípica PKC $\zeta$  por acción de la ceramida, probablemente concomitante con su reclutamiento hacia la membrana, conduce también a la inhibición de Akt y de las funciones proapoptóticas y a la regulación del potencial de membrana [Bourbon et al., 2002; Fox et al., 2007; Wang et al., 2005]. La formación de microdominios enriquecidos en ceramida o plataformas lipídicas denominadas “*lipid rafts*” desempeña un papel muy importante en la señalización celular, ya que las alteraciones de los dominios de membrana debidas al aumento de la ceramida y a su tendencia a auto-asociarse, afectan la composición de la membrana y las interacciones de los lípidos y de las proteínas de señalización. Estas plataformas están implicadas en una variedad de cascadas de señalización en células inmunes como la activación de las células B, la infección por patógenos bacterianos y la liberación de citoquinas durante la infección y son importantes en la inducción de apoptosis [Henry et al., 2013].

La ceramida puede ser convertida también en ceramida-1-fosfato (C1P) que tiene acciones específicas, como la activación de la fosfolipasa A2 citosólica (cPLA2) y la regulación de la apoptosis [Chalfant and Spiegel, 2005; Mitra et al., 2007]. La C1P es producida por la ceramida quinasa (CERK) a nivel de la región Trans-Golgi (Trans-Golgi network, TGN). La C1P activa la fosfolipasa-A2 $\alpha$  citosólica (cPLA2 $\alpha$ ) [Pettus et al., 2004], la enzima que libera el araquidonato, el precursor de los eicosanoides. La C1P inhibe la ADAM17 (también conocido como enzima de conversión del factor de necrosis tumoral TNF, o TACE), la principal metaloproteasa responsable de la escisión

del pro-TNF para liberar la forma inflamatoria activa, probablemente mediante la unión a uno o más motivos tribásicos similares [Lamour et al., 2011].

### 2.5.3. Esfingosina y esfingosina-1-fosfato (S1P)

La ruptura del enlace amida de la ceramida producido por las enzimas CDasas libera esfingosina y ácidos grasos. A diferencia de la ceramida, que puede ser formada *de novo* o por hidrólisis de la esfingomielina, la esfingosina es producida a partir de la ceramida en la reacción catalizada por las CDasas o mediante hidrólisis de los esfingolípidos de la membrana plasmática [Michel and van Echten-Deckert, 1997]. La esfingosina es una importante molécula de señalización que regula el ciclo celular y la apoptosis mediante la modulación de proteínas quinasas y otras vías de señalización [Ma et al., 2005]. La esfingosina sirve también como sustrato para la esfingosina quinasa y, por lo tanto, como precursor de esfingosina-1-fosfato. S1P se sintetiza por dos isoenzimas de la esfingosina quinasa (SphK1, SphK2) y es degradado por acción de las S1P fosfatasas, las fosfatasas o S1P liasa [Spiegel and Milstien, 2003]. Las plaquetas carecen de S1P liasa, razón por la cual se implica a estas células como fuentes de S1P en cantidad relativamente alta (0.5 mM) en el suero [Allende and Proia, 2002], donde se une a la albúmina y a las lipoproteínas de alta densidad [Murata et al., 2000]. Sin embargo, otras células tales como eritrocitos, neutrófilos, mastocitos, células mononucleares y células endoteliales también pueden secretar S1P [Olivera et al., 1999; Pappu et al., 2007; Yatomi et al., 2001]. En todo caso el control de S1P extracelular es complejo y parece también implicar la exportación de SphK-1a para producir S1P fuera de las células [Venkataraman et al., 2006], la degradación por fosfatasas específicas para lípidos (que son proteínas integrales de membrana localizadas en el lado extracelular) y la recaptación [Zhao et al., 2007]. La actividad de SphK es inducida por una variedad de estímulos [Taha et al., 2006], entre los cuales destacan los agonistas de los receptores muscarínicos M2 (que conducen a la constricción de las vías respiratorias [Pfaff et al., 2005], la activación de los receptores de IgE [Oskeritzian et al., 2008], la histamina, varios factores de crecimiento y diversas citoquinas [Alemany et al., 2007].

La S1P está implicada en la regulación de diferentes procesos celulares, como son: proliferación y supervivencia celular, angiogénesis, funciones de la barrera endotelial, movilidad celular, quimiotaxis, organización del citoesqueleto, homeostasis del calcio intracelular y la adhesión celular [Alemany et al., 2007; Spiegel and Milstien, 2003;

Watterson et al., 2003]. Las diversas funciones de S1P en la inmunidad innata y adaptativa (inmunovigilancia, tráfico de células inmunes y diferenciación, integridad de la barrera endotelial), están mediados por su unión a uno de los cinco receptores acoplados a la proteína G, que son S1P<sub>1</sub>- S1P<sub>5</sub>. La señalización inducida por estos receptores es compleja porque se expresan de forma diferente en las células inmunes y endoteliales y se acoplan a un conjunto variado de proteínas G heterotriméricas. Por ejemplo, la activación de S1P<sub>1</sub> generalmente promueve la migración celular y la salida de los linfocitos T y B de los tejidos linfoides [Cyster and Schwab, 2012], mientras que S1P<sub>2</sub> inhibe la motilidad para promover la retención de las células B en los centros germinales [Green et al., 2011]. Muchas evidencias muestran que los diferentes subtipos de receptores de S1P pueden actuar antagonicamente, como en la quimiotaxis (la estimulación es mediada por S1P<sub>1</sub> y S1P<sub>3</sub>, y la inhibición por S1P<sub>2</sub>) [Spiegel et al., 2002] o en las funciones de la barrera endotelial. Otro interesante antagonismo parece existir entre S1P y ceramida puesto que la primera tiene efectos antiapoptóticos y la segunda proapoptóticos [Spiegel and Milstien, 2003]. En vista de las consecuencias sobre el crecimiento y la diferenciación celular, y en consideración de los niveles de ceramida y S1P altamente dinámicos, este antagonismo se ha denominado " reóstato " de los esfingolípidos [Spiegel and Milstien, 2003]. Además los receptores de S1P muestran una alta homología con los receptores para el ácido lisofosfatídico, LPA<sub>1/2/3</sub>, [Yang et al., 2002] y algunos receptores pueden incluso reconocer al ácido lisofosfatídico [Murakami et al., 2008]. Mucho menos se sabe acerca de las dianas intracelulares de S1P, aunque en la última década, se han caracterizado algunas nuevas. Por ejemplo se ha demostrado que S1P, formada por SphK1 en respuesta a TNF o interleuquina-1 (IL-1), se une al factor 2 asociado al receptor del TNF (TRAF2) y al inhibidor 2 de la apoptosis celular (cIAP2), respectivamente, e induce actividades de poliubiquitinilación a nivel de la lisina 63 [Alvarez et al., 2010; Harikumar et al., 2014]. En respuesta a IL-1, que tiene un papel fundamental en las enfermedades autoinflamatorias, cIAP2 y SK1 forman un complejo con el factor-1 regulador del interferón (IRF1), que conduce a su poliubiquitinilación y activación. Consiguientemente IRF1 aumenta la expresión de las quimioquinas CXCL10 y CCL5 que reclutan células mononucleares hacia los sitios estériles de inflamación [Harikumar et al., 2014]. Por lo tanto, además de la señalización del receptor S1P canónica, estas nuevas funciones intracelulares de S1P pueden estar involucradas en las respuestas inmunes e inflamatorias inducidas por citoquinas.

## 2.6. Papel fisiopatológico de los esfingolípidos a nivel pulmonar

La alteración de la vía de señalización de los esfingolípidos puede desempeñar un papel fisiopatológico en varias condiciones tales como la diabetes, la aterosclerosis, la insuficiencia cardíaca crónica, la sepsis, el cáncer y varias enfermedades pulmonares incluyendo SDRA, fibrosis quística, EPOC y DBP [Gulbins and Li, 2006; Larsen and Tennagels, 2014; Tibboel et al., 2014]. Recientes evidencias sugieren un importante papel de los esfingolípidos en los procesos de daño y reparación pulmonar [Tibboel et al., 2014] y en el desarrollo pulmonar, puesto que se han observado niveles constantes de esfingomielina alveolar durante todo el periodo gestacional [Gluck et al., 1971]. De hecho, recientemente se ha propuesto la posible implicación de los esfingolípidos en la maduración vascular durante el desarrollo de los vasos sanguíneos embrionarios y postnatales [Mulders et al., 2007]. Así, la delección específica del receptor S1P<sub>1</sub> en células endoteliales permite la formación de los tubos endoteliales embrionarios, pero impide la organización apropiada de las células de músculo liso lo que conduce a hemorragia embrionaria y a muerte intrauterina [Allende et al., 2003]. Además, se ha descrito la regulación del metabolismo de los esfingolípidos en pulmones de rata y se ha observado el aumento de los niveles de SMasa y ceramidas durante la maduración del pulmón de rata [Allende et al., 2003] y la disminución de tales niveles después del nacimiento. Nuestro grupo ha demostrado en embriones de pollo que también la activación de la nSMasa y la consiguiente producción de ceramida están implicados en la vasoconstricción pulmonar hipóxica, evento responsable de la alta resistencia vascular pulmonar durante la vida fetal [Moreno et al., 2014], revelando que la ceramida es un mediador crítico en la regulación del tono vascular pulmonar. De hecho, la producción de ceramida es un evento temprano y necesario en la cascada de señalización de la VPH que conduce a la activación de PKC $\zeta$ , la producción de especies reactivas del oxígeno, la inhibición de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv), la vasoconstricción y el aumento de la presión pulmonar [Cogolludo et al., 2009a; Frazziano et al., 2011; Moral-Sanz et al., 2011].

Además del desarrollo pulmonar y de la regulación del tono vascular, los esfingolípidos están también implicados en respuestas inflamatorias, enfermedades pulmonares e infecciones con patógenos. La instilación de TNF lleva a un aumento en los niveles de esfingomielina y de la actividad de la aSMasa, que induce la formación de la ceramida y afecta las funciones del surfactante en ratas [Ryan et al., 2003] y probablemente



también su producción en células pulmonares humanas H441 [Vivekananda et al., 2001]. Además, evidencias experimentales y clínicas indican el papel crítico de la forma secretada de la aSMasa en la patogénesis del DPA y de la sepsis. La aSMasa tiene un papel importante a nivel fisiopatológico y se considera un mediador clave del edema pulmonar en modelos experimentales de daño pulmonar agudo [Goggel et al., 2004]. La aSMasa es secretada por las células endoteliales ante un estímulo bacteriano y sus niveles plasmáticos aumentan en pacientes en estado crítico [Claus et al., 2005]. Se ha observado una regulación positiva de la forma secretada en respuesta a citoquinas inflamatorias en cultivos de células endoteliales [Marathe et al., 1998] y también en modelos de inflamación sistémica aguda en ratón inducida por la inyección de LPS, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  [Lozano et al., 2001; Wong et al., 2000]. En apoyo a los datos de LPS, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* específicamente y de forma aguda inducen la regulación positiva de la aSMasa secretada a través de los macrófagos, lo que sugiere que la regulación de la enzima por los mediadores inflamatorios pueda implicar mecanismos compartidos por la respuesta inmune innata [McCollister et al., 2007]. Una elevada actividad de la aSMasa se ha encontrado en pacientes con diabetes tipo II [Gorska et al., 2003], insuficiencia cardíaca caquética [Doehner et al., 2007], sepsis [Claus et al., 2005], hipercitoquinemia [Takahashi et al., 2002], y en respuesta a terapia de radiación ionizante en pacientes con cáncer [Sathishkumar et al., 2005]. Además, recientes evidencias sugieren un papel de la aSMasa en la respuesta a diversos agentes patógenos [Dreschers et al., 2007]. En respuesta a la infección, se ha demostrado que la aSMasa se localiza en la cara externa de la membrana plasmática, generando ceramida, que a su vez promueve la formación de microdominios [Grassme et al., 2003] y probablemente la fusión de diferentes compartimentos de membrana (Utermöhlen O et al., 2008) y la maduración del fagolisosoma (Schramm M et al., 2008; Utermöhlen O et al., 2003). La aSMasa puede ser liberada tanto por las células endoteliales como por otros tipos celulares incluyendo las plaquetas activadas [Romiti et al., 2000]. Los mediadores de sepsis y SDRA, incluyendo el PAF [Goggel et al., 2004] y TNF [Ryan et al., 2003], inducen un aumento de la actividad de la aSMasa tanto *in vitro* como *in vivo*, en muestras de suero o LBA. Además, se ha propuesto que la IL-1 medie el aumento de la actividad de la esfingomielinasa ácida circulante inducida por el LPS [Wong et al., 2000]. En modelos animales de sepsis y DPA, la actividad de la enzima se encuentra incrementada en el suero durante la endotoxemia [Claus et al., 2005; Wong et al., 2000], en los pulmones después de la inhalación de LPS [von Bismarck et al., 2008] o después

del lavado broncoalveolar [von Bismarck et al., 2007; von Bismarck et al., 2008]. No solo en modelos experimentales, también en pacientes con sepsis, los niveles sistémicos y la actividad de la aSMasa están aumentados y los niveles de ceramida en plasma o en monocitos se correlacionan con la mortalidad [Claus et al., 2005].

Así la inhibición de la aSMasa por D609, NB6 o secundaria a la delección del gen de la aSMasa en ratones reduce la mortalidad asociada al shock séptico inducido por TNF-alfa o LPS [Claus et al., 2005; Haimovitz-Friedman et al., 1997; Machleidt et al., 1996]. En el DPA inducido por ácido, el tratamiento con D609 atenúa el edema pulmonar y mejora la oxigenación [Goggel et al., 2004]. Por otra parte, la inhibición de la aSMasa por D609 o imipramina atenúa la lesión pulmonar aguda causada por el factor activador de plaquetas (PAF) o LPS [Goggel et al., 2004]. Además, la imipramina reduce la formación de edema y promueve la oxigenación en el DPA inducido por lavado broncoalveolar repetido, cuando se administra junto con un surfactante [von Bismarck et al., 2008]. Aunque los mecanismos a través de los cuales estos inhibidores ejercerían sus efectos protectores no están del todo claros, hay varias explicaciones posibles. Los primeros trabajos han demostrado que el D609 previene tanto la expresión de las moléculas de adhesión inducida por TNF en la vasculatura pulmonar como la infiltración de los leucocitos [Machleidt et al., 1996], que son considerados críticos en la patogénesis del DPA. Estos descubrimientos sugieren que la inhibición de la aSMasa podría ser una diana terapéutica útil en el tratamiento de DPA y sepsis. La inhibición de la nSMasa también disminuye la inflamación pulmonar y aumenta la supervivencia en un modelo de SDRA inducido por el LPS [Lin et al., 2011]. Otros estudios demuestran que la nSMasa está implicada en la apoptosis alveolar y que es activada por las especies reactivas de oxígeno [Castillo et al., 2007]. Por lo tanto, como consecuencia del aumento de la actividad de la SMasa en situaciones patológicas, los niveles de ceramida también se incrementan en pacientes con SDRA [Lin et al., 2011] y en modelos animales de lesión pulmonar aguda [Goggel et al., 2004; von Bismarck et al., 2008] llevando a la apoptosis celular endotelial pulmonar, al aumento de la permeabilidad vascular y a la formación de edema. La ceramida también es capaz de dañar las células endoteliales pulmonares y hepáticas durante la sepsis. De hecho, tanto la instilación de ceramida en la vías respiratorias de rata [Ryan et al., 2003] como la perfusión de ceramida C2 en pulmones aislados de rata causan edema [Goggel et al., 2004]. Además, la ceramida aumenta la permeabilidad vascular en cultivos de células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana [Lindner et al., 2005]. La inhibición de la

formación de la ceramida por ablación genética de la aSMasa o por NB6 atenúa la apoptosis inducida por el LPS en el pulmón y el hígado y reduce también la mortalidad [Claus et al., 2005; Machleidt et al., 1996]. Anticuerpos específicos para la ceramida bloquean el edema inducido por PAF tanto en pulmones aislados de rata como *in vivo* [Goggel et al., 2004]. También en macrófagos y eritrocitos, el PAF estimula rápidamente la formación de la ceramida por la activación de la aSMasa [Goggel et al., 2004; Lang et al., 2005] y su inhibición reduce en parte el edema a nivel pulmonar [Goggel et al., 2004; Uhlig et al., 2005]. Por último, el L108 (un inhibidor de la PLC específica para fosfatidilinositol y de la liberación del calcio mediada por IP<sub>3</sub>) previene tanto la formación de edema inducida por PAF [Goggel and Uhlig, 2005; Goggel et al., 2004] como la hiperpermeabilidad inducida por la ceramida en células endoteliales [Lindner et al., 2005]. No solo la ceramida, también la esfingosina-1-P regula la permeabilidad endotelial y epitelial. Así mientras que los receptores endoteliales S1P<sub>2</sub> y S1P<sub>3</sub> y los epiteliales S1P<sub>3</sub> desestabilizan dicha barrera, los receptores endoteliales S1P<sub>1</sub> tienen un efecto estabilizador. La S1P endotelial estabiliza las uniones celulares adherentes [Lee et al., 1999] mediante los receptores S1P<sub>1</sub>, activando la reorganización del citoesqueleto y el complejo de adhesión focal dependiente de la GTPasa Rac [McVerry and Garcia, 2004]. En pulmones, esto queda demostrado por el efecto estabilizador de la barrera endotelial por parte de los agonistas de los receptores S1P<sub>1</sub> [Garcia et al., 2001] y por la formación de edema pulmonar debido al uso de W146, un antagonista de los receptores S1P<sub>1</sub> [Payne et al., 2007]. Se ha observado también que la S1P protege contra el DPA y el edema pulmonar inducido por LPS y secundario a isquemia/reperfusión [Okazaki et al., 2007; Peng et al., 2004]. Estas acciones se oponen a la activación de los receptores S1P<sub>2</sub>, que provocan la inhibición de Rac a través de la quinasa Rho e inducen la interrupción de las uniones adherentes, un proceso que contribuye a edema en modelos de daño pulmonar inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en rata [Sanchez et al., 2007]. La activación de la quinasa Rho se ha demostrado también para los receptores S1P<sub>3</sub> que median el aumento de la permeabilidad epitelial en ratones [Gon et al., 2005] y en células pulmonares humanas [Singleton et al., 2007]. En resumen, el edema pulmonar inducido por el aumento de la permeabilidad vascular, elemento clave de la mayoría de las enfermedades pulmonares, podría ser atenuado por activación de los receptores S1P<sub>1</sub>, por bloqueo de los receptores S1P<sub>2</sub> y S1P<sub>3</sub> o por inhibición de la aSMasa. Por último, se ha demostrado que el inmunosupresor FTY720, un profármaco que se activa por fosforilación por acción de SphK2, interfiere con los receptores de la

S1P, excepto S1P<sub>2</sub> [Mandala et al., 2002] y es protector en modelos animales de DPA [Peng et al., 2004] y asma [Idzko et al., 2006]. La forma no fosforilada del fármaco FTY720 parece tener efectos independientes de los receptores de S1P [Dudek et al., 2007]. El inhibidor de la esfingosina quinasa SKI-2 previene la quimiotaxis de los polimorfonucleares, pero no tiene efectos sobre la hemodinámica en un modelo de trauma y choque hemorrágico [Lee et al., 2004]. Además de la regulación de la permeabilidad vascular y epitelial, la ceramida es un mediador crucial en el desarrollo del enfisema pulmonar [Petrache et al., 2005]. En modelos animales de enfisema inducidos por bloqueo de los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), se observa un aumento de la producción de la ceramida, principalmente en las células alveolares, pero la inhibición de la vía de la ceramida sintasa, mediante fumosina B o miriocina, previene la muerte celular alveolar y el estrés oxidativo, que son eventos característicos del enfisema [Petrache et al., 2008; Petrache et al., 2005]. Por lo tanto, la administración a nivel pulmonar de ceramida exógena activa la caspasa 3 e induce apoptosis de las células alveolares con posterior desarrollo del enfisema. De acuerdo con estos datos, los pacientes con enfisema tienen altos niveles de ceramida, localizados en las células septales alveolares y en los macrófagos. Por último tanto la aSMasa como la ceramida parece que estén implicadas en la infección bacteriana y viral. Recientes evidencias demuestran que la bacteria *P. aeruginosa* induce la activación y la translocación de la aSMasa desde la parte intracelular a la extracelular de la membrana celular con consecuente formación de ceramida y plataformas de membrana ricas en ceramida [Grassme et al., 2003]. Así, la deficiencia genética de la aSMasa o la alteración de las balsas lipídicas, mediante interferencia con el colesterol celular, previene la formación de plataformas de membrana ricas en ceramida en respuesta a la infección con *P. aeruginosa* y afecta a las etapas del proceso de infección: internalización de la bacteria, apoptosis de la células infectadas y liberación incontrolada de citoquinas [Grassme et al., 2003]. La presencia de estos microdominios resulta ser muy importante también en la infección viral. Por lo tanto, la destrucción de las balsas lipídicas por extracción de colesterol, previene la internalización del virus. Además se ha observado que la inhibición de la aSMasa mediante fármacos o moléculas pequeñas de ARN de interferencia (ARNi, del inglés siRNA) impide la infección de las células epiteliales humanas por rinovirus. En definitiva, un creciente número de evidencias sugiere la implicación de los esfingolípidos en diferentes patologías

pulmonares y, por lo tanto, podrían representar una posible diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades como el SDRA.

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



El daño pulmonar agudo (DPA), actualmente definido según la clasificación de Berlín como forma leve del síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), se caracteriza por edema pulmonar y colapso alveolar que conduce a hipoxemia arterial grave. Aunque las estrategias protectoras de soporte ventilatorio han permitido mejorar el pronóstico de los pacientes, la mortalidad asociada se mantiene intolerablemente elevada. Además, la existencia de disfunción vascular pulmonar es un factor independiente asociado a un peor pronóstico en estos pacientes. Las causas más frecuentes de DPA/SDRA son la sepsis y los traumatismos. En los casos asociados a shock hemorrágico traumático se considera que la isquemia esplácnica, la inflamación y la pérdida de la función de barrera intestinal son los eventos iniciales implicados en el desarrollo de SDRA.

Dado que el SDRA es una de las principales causas de muerte en pacientes con traumatismos y que no existen en este momento tratamientos efectivos que reduzcan la mortalidad asociada al SDRA, salvo el soporte hemodinámico y las estrategias protectoras de soporte ventilatorio, el descubrimiento de nuevos tratamientos efectivos tendría un gran impacto en la supervivencia de los pacientes.

Los esfingolípidos y sus productos de hidrólisis (ceramidas), catalizados por las enzimas esfingomielinasas (SMasas), desempeñan un papel clave en las vías de transducción de señales implicadas en procesos fisiológicos fundamentales como el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular. La nSMasa se ha implicado en el mecanismo de la vasoconstricción pulmonar hipóxica. Los esfingolípidos podrían desempeñar un papel en el SDRA. Así los niveles de ceramida están elevados en pacientes con SDRA y la inhibición de la aSMasa previene el daño pulmonar agudo inducido por el factor activador de las plaquetas (PAF).

La imipramina, desipramina y el D609 son compuestos no relacionados químicamente que tienen en común su capacidad de inhibir la esfingomielinasa ácida.

La quercetina es un flavonoide presente en la dieta que es capaz de atenuar la inflamación sistémica y reducir la mortalidad, probablemente a través de la inhibición de la liberación de las proteínas nucleares HMGB1, en un modelo de endotoxemia en rata.

La **hipótesis general** que nos planteamos en esta Tesis Doctoral es que la mortalidad y la respuesta inflamatoria vascular pulmonar asociadas al DPA inducido por endotoxina



o por traumatismo y hemorragia se pueden prevenir mediante inhibidores de la aSMasa y/o quercetina.

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es, por lo tanto, la caracterización del papel de la aSMasa en el DPA y la identificación de posibles estrategias farmacológicas.

Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes apartados:

1. Determinar el papel de la activación de la aSMasa en la respuesta inflamatoria vascular y la disfunción vascular pulmonar inducida por endotoxina, *in vitro* e *in vivo*.
2. Determinar si la inhibición de la esfingomielinasa ácida con D609 previene la mortalidad y la respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica inducida por endotoxina.
3. Determinar si la inhibición de la esfingomielinasa ácida con D609 o imipramina y la quercetina previenen la mortalidad y la respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica inducida por shock traumático hemorrágico.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 70 ratas Wistar macho adultas (12 semanas) de 275-325 g procedentes de Harlan (Barcelona) para el modelo de shock traumático hemorrágico y 21 ratas para el modelo de instilación intratraqueal de lipopolisácarido (LPS). Todos los animales se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina (UCM) y recibieron comida y agua *ad libitum* y fueron sometidos a un ciclo normal de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los experimentos cumplen los requisitos necesarios explicitados en el Real Decreto 1201/2005 y 53/2013 sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Experimentación animal de la UCM.

### 1.1. Modelo de instilación intratraqueal de lipopolisácarido

**Anestesia y protocolo.** Las ratas fueron anestesiadas i.p. con una mezcla de ketamina (80 mg/kg) y xilacina (8 mg/kg). Antes de instilar LPS o solución salina (SS), se administró i.p. vehículo (DMSO) o D609 (50 mg/Kg de peso corporal) en función del grupo experimental. Transcurridos 30 minutos, se hizo una incisión a las ratas por encima del esternón separando los paquetes musculares hasta ver la tráquea y con una aguja acoplada a una jeringa se les administró por vía intratraqueal (IT) 50 µl de solución salina (control, Ctrl) o de la solución con LPS (300 µg/Kg) cerrando a continuación la incisión. Cuatro horas después de la instilación, se volvió a anestesiarse los animales, se ventiló a los animales con aire ambiental (volumen tidal: 9 mL/Kg; frecuencia respiratoria: 60 resp/min y presión positiva al final de la espiración, PEEP: 2 cm<sup>2</sup> de agua). El registro de la presión arterial pulmonar (PAP) se realizó a torax abierto. Acoplando el animal a un ventilador mecánico y empleando un transductor de presión, se introdujo un catéter a través del ventrículo derecho, hasta la salida de la arteria pulmonar principal. Una vez finalizado el registro de los parámetros hemodinámicos, se sacrificaron los animales mediante sección del corazón y se procedió a la recogida de muestras para su posterior análisis.

**Grupos.** Los animales (n=6-9 por grupo) se dividieron aleatoriamente en 3 grupos: 1) grupo control (DMSO-SS), los animales recibieron una dosis de vehículo (dimetilsulfóxido, DMSO) por vía i.p. 30 minutos antes de una instilación IT de

solución salina (SS) (DMSO-SS), 2) grupo DMSO-LPS, una dosis de DMSO i.p 30 minutos antes de la instilación IT de LPS (300 µg/Kg peso) y 3) grupo D609-LPS, una dosis de D609 (50 mg/Kg peso) administrada por vía i.p. 30 minutos antes de la instilación IT de LPS.

**Recogida de muestras.** Se extrajo sangre directamente de la cánula del corazón, se recogió en un vacutainer con citrato de sodio y se centrifugó (1000 rpm, 15 min, a temperatura ambiente) para obtener el plasma y se almacenó todo en criotubos a -80°C hasta su posterior utilización. Tras ligar el pulmón derecho, se realizó el lavado broncoalveolar (LBA) en el pulmón izquierdo mediante la administración a través de la traqueotomía, de 2.5 ml de SS fría y su posterior recuperación. Tras realizar esta operación 4 veces, se centrifugó a 1500 rpm, durante 10 minutos y se congeló a -80°C el sobrenadante, para medir posteriormente la concentración de proteínas (mg/ml), IL-6 (pg/ml) e IgM (ng/ml). Después de resuspender el precipitado celular, se realizó el conteo de células en una cámara de Neubauer en un microscopio óptico. En algunos animales, en lugar de realizarse el LBA, se administraron 10 ml de formaldehído al 4%, se cortó en bloque el pulmón izquierdo y se guardó en falcon rellenos de formaldehído para su posterior análisis histológico.

Tras extraer y pesar el lóbulo más grande del pulmón derecho, se introdujo en una estufa a 50°C durante 24 horas. Trascurrido este tiempo, se volvió a pesar el lóbulo y la proporción peso fresco/peso seco se empleó para determinar el grado de edema pulmonar. Los dos lóbulos restantes se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para medir la actividad de la esfingomielinasa ácida y de la mieloperoxidasa como marcadores en procesos inflamatorios.

## **1.2. Modelo de shock hemorrágico y traumático**

**Anestesia, colocación de catéteres, monitorización hemodinámica y saturación de O<sub>2</sub>.** Las ratas fueron anestesiadas i.p. con una mezcla de ketamina (80 mg/kg)/ xilacina (8 mg/kg). Tras la anestesia, se les hizo una pequeña incisión en la piel y se canularon, con un catéter de polietileno (PE-50), la arteria carótida, para el registro continuo de presión arterial media, frecuencia cardíaca y recogida de muestras de sangre y la vena yugular interna, para la administración de fármacos y de anestesia. Los dos catéteres fueron fijados con hilo de sutura y la temperatura de la rata se mantuvo alrededor de

37°C, usando una manta eléctrica sobre la plataforma quirúrgica. Los animales permanecieron anestesiados durante todo el experimento a través de una perfusión intravenosa continua de ketamina y xilacina (60 and 3 µg/kg/min, respectivamente). La presión arterial media y la frecuencia cardíaca se midieron continuamente a través de la arteria carótida que estaba conectada a un transductor de presión y se registraron en un monitor. La presión parcial de O<sub>2</sub> y de CO<sub>2</sub>, saturación de O<sub>2</sub>, pH, concentración de hemoglobina, hematocrito, electrolitos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), se midieron utilizando un analizador de gases (i-Stat, Softonic) tras el periodo de shock (grupos Sham y Shock+vehículo) y al final del experimento en todos los grupos.

**Grupos.** Los animales (n = 11-20 por grupo) se distribuyeron de manera aleatoria en 5 grupos: 1) Grupo control más vehículo (100 µl DMSO, sham), no es sometido a laparotomía ni a la hemorragia controlada, 2) Shock más vehículo (Shock), 3) Shock + D609 (20 mg/kg), 4) Shock + Imipramina (1 mg/kg) y 5) Shock + Quercetina (50 mg/kg).

En experimentos preliminares en tres animales, se observó una mortalidad del 66% empleando una dosis de imipramina de 10 mg/kg, lo que nos condujo a reducir la dosis a 1 mg/kg con la que se realizaron el resto de los experimentos.

**Inducción del shock hemorrágico traumático y resucitación.** Tras la inserción de los catéteres, las ratas se sometieron a un periodo de estabilización de 10 minutos. A continuación, las ratas del grupo sham se monitorizaron durante 180 minutos y el vehículo fue suministrado a los 90 minutos (100 µl DMSO infundido manualmente en un tiempo total aproximado de 5 minutos). Las ratas del grupo shock fueron sometidas a un protocolo de trauma y shock hemorrágico seguido de resucitación [Doucet et al., 2010]. Se realizó una laparotomía de unos 3 cm (trauma) y se expuso el intestino durante 15 minutos cerrándose posteriormente con hilo de sutura. El shock hemorrágico se indujo reduciendo la presión arterial a 35 mm Hg, manteniéndose a este nivel durante 75 min mediante la extracción o reinfusión de sangre, según fuera necesario. Al finalizar el shock hemorrágico, se rescataron los animales por la reinfusión de la sangre extraída con el mismo volumen de Ringer Lactato (0.5 ml/min; aproximadamente sobre un tiempo de 20-30 minutos) para restaurar la presión a los valores pre-shock, a través de la vena yugular, utilizando una bomba de infusión [Doucet et al., 2010; Ronn et al., 2011].

Los fármacos (quercetina, imipramina y D609) y el vehículo se administraron por vía intravenosa justo antes de la reinfusión de rescate. Los animales se sacrificaron al final del experimento (3 horas) y se procedió a la recogida de muestras. En caso de mortalidad se registró el tiempo de la muerte para el análisis de supervivencia.

**Recogida de muestras.** Utilizamos una jeringa de 2 ml heparinizada para extraer sangre a través del catéter de la arteria carótida, tras la fase de shock (500  $\mu$ l) y al final del experimento (3-5 ml); para la extracción de esta última muestra no se utilizó una jeringa heparinizada sino que se recogió la sangre en un tubo con citrato de sodio. El plasma sanguíneo se obtuvo por centrifugación (1000 rpm, 15 min, a temperatura ambiente) y se almacenó en criotubos a -80°C hasta su posterior utilización. A través de una traqueotomía, se administraron 10 ml de SS fría (2.5 ml/cada infusión, 4 veces en total), del cual se recogieron aproximadamente 7-8 ml de LBA. Se centrifugó a 1500 rpm, durante 10 minutos a temperatura ambiente y se congeló a -80°C el sobrenadante y el precipitado celular, después de haberlo resuspendido y de haber contado el número de células. El sobrenadante se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas (mg/ml), IL-6 (pg/ml) e IgM (ng/ml).

También se recogieron dos lóbulos del pulmón derecho en nitrógeno líquido hasta su almacenamiento a -80°C para medir la actividad de la esfingomielinasa ácida y de la mieloperoxidasa como marcadores en procesos inflamatorios. El lóbulo sobrante del pulmón derecho, se pesó y se metió en una estufa a 50°C durante 24 horas; transcurrido ese tiempo, se volvió a pesar para la valoración del edema pulmonar. En algunos animales los pulmones fueron utilizados para la evaluación histopatológica y a través de una traqueotomía se administraron 10 ml de formaldehído al 4%, ligando el lado izquierdo del pulmón para evitar que le entrara formaldehído. Se cortó en bloque el pulmón derecho y se guardó en un tubo cubriéndolo con formaldehído para su posterior análisis.

### 1.3. Modelos *in vitro*

**Cultivos primarios de músculo liso vascular de arterias pulmonares.** Las arterias pulmonares (AP) de resistencia procedentes de rata Wistar macho fueron disecadas en solución salina fisiológica libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (PSS) filtrada con la siguiente composición (en mM): NaCl 130, KCl 5,  $\text{MgCl}_2$  1.2, glucosa 10, HEPES 10, ajustada a un pH de 7.3 con

NaOH. En condiciones estériles, debajo de una campana biológica, se lavó un par de veces las AP con la solución PSS y posteriormente se añadió una solución enzimática preparada en HEPES sin  $\text{Ca}^{2+}$  con la siguiente composición (en mg/ml): colagenasa 1.125, elastasa 0.1, albumina 1. Se mantuvieron en esta solución a 4°C durante 4 minutos para posteriormente incubarlas durante un minuto a 37°C en una incubadora de cultivos de  $\text{CO}_2$  (Mettler; 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad). Tras este proceso, se cambió la solución enzimática por HEPES sin  $\text{Ca}^{2+}$  y se lavaron las AP 4-5 veces. Terminados los lavados, se añadió medio DMEM (20% de suero fetal bovino SFB, solución de antibióticos con 10000 UI/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina y 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anfotericina B, 1% de aminoácidos no esenciales y 11 mg/ml de piruvato) 2-3 veces, agitando vigorosamente y se colocaron los tejidos en las placas Petri. Se abrieron las AP a lo largo del eje longitudinal, se eliminó mecánicamente el endotelio, se cortaron en pequeños fragmentos (2x2 mm) y se colocaron de forma homogénea en las placas Petri con la cara luminal pegada al plástico. Se añadió el medio de cultivo con 20% SBF con cuidado de no despegar los tejidos y se metieron en la incubadora. Al día siguiente, se cambió el medio y luego se esperó hasta que las células de músculo liso vascular (CMLV) comenzaran a migrar de los explantes.

Cuando las células alcanzaron un 90-100% de confluencia en regiones cercanas a los explantes, se tripsinizaron (Trypsin-EDTA solution 1X T4174, Sigma) y pasaron a frascos para cultivos celulares o placas, según las necesidades. El día siguiente al pase de células se cambió el medio de cultivo y este procedimiento se repitió cada 48 horas hasta que las células alcanzaran de nuevo un 90% de confluencia. Desde el primer pase, se usó medio con menor concentración de SBF (10%). Para los experimentos se usaron CMLV de AP de pase 2 y 3.

**Tratamiento de anillos y de CMLV de AP de rata.** Se utilizaron anillos de AP y cultivos primarios de células del músculo liso vascular de AP (CMLVAP) de rata. Las células se incubaron durante 24 horas en medio DMEM (10% de SFB, solución de antibióticos con 10000 UI/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina y 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anfotericina B, 1% de aminoácidos no esenciales con o sin 11 mg/ml de piruvato) en ausencia (control) o presencia de LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o esfingomielinasa (SMasa) bacteriana (0.1 U/ml; *Bacillus cereus*). En algunos experimentos, las células se incubaron 40-60 minutos antes de la adición del estímulo en presencia o ausencia de los fármacos moduladores de la respuesta inflamatoria, como el glucocorticoide dexametasona ( $10^{-9}$ -



$10^{-6}$  M), el inhibidor de TAK-1 5z-7-oxozeaenol ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M), el inhibidor de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) 1400W ( $10^{-5}$  M), el inhibidor del receptor TLR4 TAK-242 ( $5 \times 10^{-8}$ - $10^{-6}$  M), el inhibidor de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> sarpogrelato ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M) y de los fármacos moduladores del metabolismo de esfingolípidos, como los inhibidores de aSMasa desipramina ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$  M) y D609 ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M). 24 horas después del tratamiento se determinaron la actividad metabólica mediante MTT en las células como marcador de viabilidad celular y los niveles de mediadores inflamatorios, IL-6 o nitrito, en el medio de cultivo, mediante ELISA (DuoSet ELISA Development Systems-R&D System) o la reacción de Griess. Los anillos de AP se incubaron en las mismas condiciones pero empleando un medio de cultivo libre de suero. Tras el periodo de incubación, los anillos se montaron en un miógrafo de alambres para analizar las alteraciones en la reactividad vascular (valoración de la función endotelial y análisis de la respuesta a diferentes vasoconstrictores).

## **2. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR (MTT)**

Con el fin de determinar la viabilidad celular se realizó un ensayo colorimétrico que emplea el bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Se añadió una solución de MTT 1 mg/ml en DMEM 10% sobre las CMLV de AP y se incubaron con la solución de MTT o medio 10% (blanco) a 37°C en la incubadora durante 30 minutos. A continuación se retiró el MTT o el medio de cultivo y, para solubilizar los cristales de formazán, se añadió DMSO en cada pocillo de las placas y se incubó a 37°C en la incubadora y posteriormente a temperatura ambiente en agitación durante 5 minutos. Finalmente se efectuó la lectura de las placas en un lector de absorbancia (Biochrom EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom) a la longitud de 540 nm.

Mediante el ensayo del MTT verificamos que ninguno de los fármacos empleado modificó la viabilidad celular en más de un 10 %. Por el contrario, el ensayo del MTT reveló que las moléculas pequeñas de ARN de interferencia (ARNi) empleadas para el silenciamiento eran tóxicas y reducían la viabilidad celular. En particular, el ARNi SMPD1C redujo la viabilidad celular un 35% y el SMPD1B un 17%, razón por la cual, al medir la producción de IL-6, corregimos los valores de concentración (pg/ml) por el número de células viables (OD MTT).

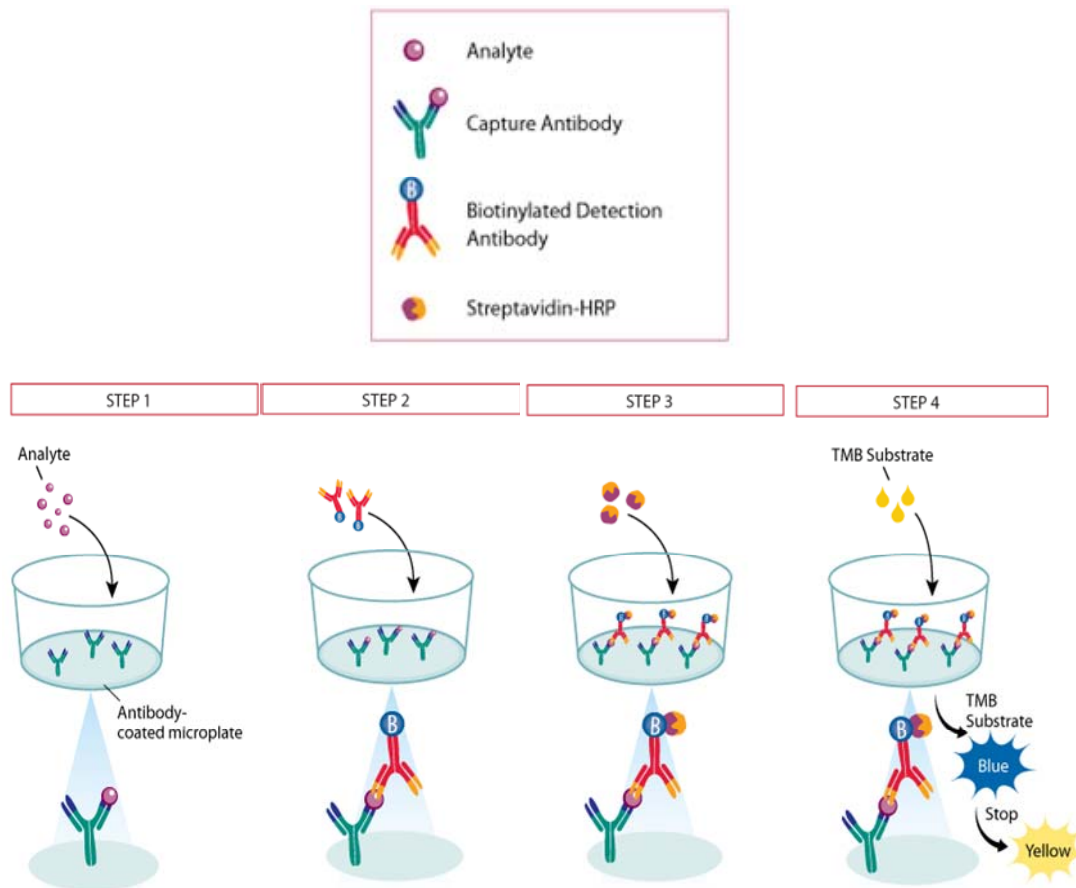
### 3. MEDIDA DE LOS NIVELES DE INTERLEUQUINAS Y INMUNOGLOBULINA M (ELISA)

Los niveles de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6) y de IgM se midieron en las muestras indicadas en la tabla 2 mediante kits de ELISA comerciales (DuoSet ELISA Development Systems-R&D System, sensibilidad de 125-8000 pg/ml (IL-6) y sensibilidad de 62.5-4000 pg/ml (IL-1 $\beta$ ); Rat IgM Ready-SET-Go affymetrix-eBioscience, sensibilidad de 0.3125-20 ng/ml). Tal y como se indica en la tabla 2, las muestras fueron analizadas sin diluir o diluidas en el tampón recomendado por el fabricante (1% albúmina de suero bovino en PBS, pH 7.2-7.4).

**Tabla 2:** Determinación de mediadores inflamatorios en las muestras procedentes de los diferentes modelos experimentales utilizados en la presente Tesis Doctoral:

<b>Modelo experimental</b>	<b>Muestra</b>	<b>Marcador analizado (dilución)</b>
<b>Modelo DPA inducido por LPS IT</b>	Plasma	IL-1 $\beta$ (1:10) IL-6 (1:10)
	LBA	IL-1 $\beta$ (Sin dilución) IL-6 (Sin dilución) IgM (1:10)
<b>Modelo shock hemorrágico y reperfusión</b>	Plasma	IL-6 (1:10) IgM (1:2000)
	LBA	IL-6 (Sin dilución) IgM (1:5)
<b>Modelo cultivos celulares: CMLVAP</b>	Medio de cultivo	IL-6 (1:10)

Para medir las citoquinas y la IgM se siguió el protocolo de los kits comerciales (figura 10).



**Figura 10.** Principio del ensayo ELISA.

#### 4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRITO (GRIESS)

La medición de óxido nítrico se realizó por medición indirecta de nitrito, que es un subproducto del óxido nítrico en el tejido vivo. La concentración de nitrito fue determinada en el medio de cultivo (sin dilución) de los anillos de AP incubados 48 horas en ausencia (Ctrl) o presencia de LPS (1µg/ml) o SMasa bacteriana (0.1 U/ml) mediante la reacción de Griess. En algunos experimentos los anillos se incubaron 40 minutos antes de la adición del LPS con diferentes inhibidores farmacológicos. Se preparó una curva patrón de nitrito de sodio de 0 a 1000 µM en DMEM 10% (el mismo medio de cultivo de las células usadas). Se añadió la curva patrón y la misma cantidad de muestra en triplicado en una placa de 96 pocillos. A continuación se mezcló el mismo volumen del reactivo 1 (sulfanilamida diluida en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O milliQ) y del reactivo 2 (Naftiletildiamina clorhídrico diluida en H<sub>2</sub>O milliQ) y se dejó estabilizar durante 10 minutos. Posteriormente se añadió la suma de estos reactivos a la curva patrón y a las muestras en proporción 1:1. Tras agitar la placa durante unos segundos, se

procedió a leer la absorbancia (Biochrom EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom) a la longitud de 540 nm. La concentración de nitrito fue determinada interpolando los valores de las muestras en la curva patrón (0-1000  $\mu$ M).

## **5. REGISTRO DE CONTRACTILIDAD EN ARTERIAS PULMONARES AISLADAS DE RATA Y HUMANAS**

Las arterias pulmonares usadas para los experimentos de reactividad vascular procedían de ratas Wistar macho adultas (Harlan, Barcelona) y de resecciones o biopsias pulmonares humanas proporcionadas por el servicio de cirugía cardiorádica del Hospital Universitario de Getafe en Madrid (Dra. Beatriz Olaiz Navarro, Dr. José Angel Lorente, Dra. Raquel Herrero y Dr. Andrés Esteban) y del Hospital Universitario de Valencia (Dr. Julio Cortijo).

### **5.1. Descripción de la técnica empleada. Registro de contractilidad en AP de resistencia**

El análisis de las respuestas contráctiles de las AP de resistencia se realizó en miógrafos isométricos (modelo 610M o 620M, Danish Myo Technology, Aarhus, Dinamarca), termostatzados (37° C), equipados con sistemas de oxigenación, y acoplados a un ordenador. La contractilidad se registraba utilizando un sistema de digitalización y análisis de señales (PowerLab de ADINSTRUMENTS) [Cogolludo et al., 2009b]. Cada arteria se sometió a una tensión correspondiente a 30 mm de Hg. Las preparaciones vasculares se incubaban en solución Krebs burbujeada según el protocolo en carbógeno (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) o en aerobio (21%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>-74%N<sub>2</sub>), para la oxigenación y el mantenimiento de un pH óptimo (7.4 aproximadamente) [Cogolludo et al., 2009b].

### **5.2. Protocolo experimental**

#### **5.2.1. Efectos del LPS, de la SMasa, del D609 y de la IL-6 en AP de resistencia incubadas.**

Para analizar la reactividad vascular se incubaron las AP de resistencia 24 horas en medio DMEM (0% SFB, solución de antibióticos con 10000 UI/ml de penicilina, 10

mg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B, 1% de aminoácidos no esenciales) en ausencia (CTRL) o presencia del LPS (1µg/ml), de la SMasa exógena (0.001 U/ml) o de la IL-6 (30 ng/ml). En algunos experimentos, los anillos de AP se trataron 40 minutos con dexametasona ( $10^{-6}$  M), 1400W ( $10^{-4}$  M), 5z-7-oxozeaenol ( $10^{-7}$  M) o con D609 ( $5 \times 10^{-5}$  o  $10^{-4}$  M) antes de ser incubados en condiciones control o en presencia de LPS. Las arterias pulmonares humanas se incubaron en las mismas condiciones de la de rata pero solo en ausencia (CTRL) o presencia de LPS (1 µg/ml) y/o con D609 ( $10^{-4}$  M). Los canales del miógrafo se envolvieron con papel film para mantener el ambiente lo más estable posible y la cámara fue constantemente burbujeadada con 21%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>-74%N<sub>2</sub> (normoxia). Se sometieron los AP a una presión de 30 mmHg, puesto que en estas condiciones los vasos son capaces de responder a hipoxia en ausencia de agentes vasoconstrictores. Una vez conseguida la tensión luminal óptima se lavó 3 veces con solución Krebs para estabilizar 30 minutos. Para verificar el estado de los vasos se contrajeron con una solución de Krebs rica en K<sup>+</sup> (80 mM), después de haber alcanzado una vasoconstricción estable se lavó 3 veces con solución Krebs para estabilizar 30 minutos. Para determinar la respuesta de los vasos a la exposición aguda de hipoxia, se expuso cada vaso a dos periodos de hipoxia (burbujeando los canales con una mezcla de 95%N<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>) de 15 minutos de duración, dejando 30 minutos de normoxia entre ellos. Además, se determinó la función endotelial en los mismos anillos de AP, precontraídos con concentraciones crecientes de serotonina (de  $3 \times 10^{-8}$  a  $10^{-5}$  o  $3 \times 10^{-5}$  M), sometiéndolos a una curva dosis-respuesta de acetilcolina (de  $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M) en condiciones de normoxia. La respuesta a acetilcolina (ACh) se expresó como porcentaje de relajación respecto a la contracción máxima inducida por la serotonina (5-HT). Posteriormente se volvió a lavar los anillos de AP y se estimularon con una curva dosis-respuesta de fenilefrina (de  $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M). La contracción a KCl, hipoxia, 5-HT y fenilefrina (Phe) se expresó como valor de fuerza contráctil corregido por la superficie del vaso ( $\text{mN/mm}^2$ ), según la fórmula de Mulvany & Halpern (1977):  $(\text{mN}/(2 \times \text{longitud segmento})) / (\text{diámetro}/2)$ . El factor 2 proviene de la longitud total de la pared, que es igual a la suma de las paredes superior e inferior del segmento montado.

### **5.2.2. Efectos de la IL-6 en agudo en AP de resistencia de rata en fresco**

Los efectos agudos de la IL-6 sobre la función endotelial se analizaron en anillos de AP frescos. De nuevo, se verificó el estado de los vasos mediante la capacidad de los

mismos para contraer ante la exposición a una solución de Krebs rica en  $K^+$  (80 mM). Tras un periodo de estabilización de 30 minutos, los anillos de AP se contrajeron con 5-HT ( $10^{-5}$  M que representa el 80% de la contracción máxima) y se realizó una curva dosis-respuesta de ACh (de  $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M) en solución Krebs burbujeada con carbógeno (95%  $O_2$ - 5%  $CO_2$ ). La respuesta a ACh se expresó como porcentaje de relajación respecto a la contracción inducida por la serotonina (5-HT  $10^{-5}$  M). Después de los lavados con la solución Krebs a 37°C, se incubaron las arterias en ausencia (CTRL) o presencia de IL6 (30 ng/ml) en agudo durante 30 minutos. Al final de la incubación se volvió a repetir la relajación a una curva dosis-respuesta de ACh, precontrayendo los anillos de AP a 5-HT  $10^{-5}$  M. La respuesta a ACh se expresó como porcentaje de relajación respecto a la contracción inducida por la serotonina tras la incubación en ausencia (CTRL) o presencia de IL-6.

## 6. INMUNOCITOQUÍMICA

### 6.1. Aislamiento y tratamiento de células de músculo liso

Las AP de resistencia fueron disecadas en una solución fisiológica carente de calcio con la siguiente composición (en mmol/L) NaCl 130, KCl 5,  $MgCl_2$  1.2, glucosa 10, HEPES 10 (ajustado a pH 7.3 con NaOH). Tras haber eliminado el endotelio, la arteria fue cortada longitudinalmente e incubada en una solución enzimática de composición (en mg/ml) papaína 1, ditiotreitól 0.8 y albúmina 0.7. Después de un tratamiento a 4°C durante 4 minutos y a 37°C durante 8-10 minutos en dicha solución enzimática, se obtenía una suspensión de células con la que se realizaron los experimentos dentro de un tiempo limitado a 2 horas máximo. Una vez extraídas las células, se sembraron en una cámara de cultivo de 8 pocillos montada en un portaobjetos (Lab-Tek II Chamber Slide<sup>TM</sup> 154534) y se dejaron posar durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se añadió a las células una solución fisiológica con calcio ( $1.5 \times 10^{-3}$  M) y después de una incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos se empezó el tratamiento.

Las células se trataron a temperatura ambiente y se incubaron durante 30 minutos en solución fisiológica con calcio en ausencia (control) o presencia de LPS (1  $\mu$ g/ml) o SMasa bacteriana (0.1 U/ml; *Bacillus cereus*). Terminado el tratamiento, se cuantificó la ceramida mediante inmunocitoquímica.

## 6.2. Cuantificación de ceramida mediante inmunocitoquímica

Las CMLVAP fueron fijadas con formaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron tres veces con PBS 0.01M para rehidratar las células y se bloquearon y permeabilizaron durante 1 hora con una solución de bloqueo (PBS con 0.4% de Triton X-100 y 3% de albúmina de suero (BSA)). Las células fueron incubadas con un anticuerpo primario de ratón anti-ceramida (1:30, MID 15B4 Enzo Life Sciences, Villeurbanne, Francia) a 4°C durante toda la noche y el día siguiente a 37°C por 15 minutos. Posteriormente se realizaron 3 lavados en PBS con 3% de BSA (4 minutos por cada lavado), se añadió el anticuerpo secundario de oveja conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:32, Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd., Suffolk, UK) y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después de 3 lavados en PBS con 3% de BSA para retirar el exceso del anticuerpo secundario, las células se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI,  $3 \times 10^{-7}$  M en PBS con 3% de BSA) a 37°C durante 5 minutos. Al final de la incubación, se lavaron las células 2 veces con PBS con 3% de BSA y una vez con solo PBS. Terminados los lavados, los portas fueron montados con Mowiol y fotografiados al microscopio de fluorescencia, para poder analizar posteriormente la concentración de ceramida mediante ImageJ (versión 1.42, National Institute of Health, USA).

## 7. SILENCIAMIENTO

El silenciamiento de la esfingomielinasa ácida (aSMasa, SMPD1) en cultivos de CMLVAP se efectuó mediante la transfección con pequeñas moléculas de ARN de interferencia (ARNi, en inglés *small interfering* siRNA) comerciales específicas para silenciar SMPD1 (Smpd1 Trilencer-27 Rat siRNA, OriGene, USA) y un reactivo de transfección (SiTran1.0, Transfection reagent designed for RNAi duplex, OriGene, USA) que permite de aumentar la eficiencia de transfección. El kit de OriGene proporciona tres diferentes ARNi específicos para la aSMasa y un control negativo (ARNi random). Según las instrucciones del proveedor, al menos dos de los tres ARNi tendrían que silenciar su diana con una eficiencia del 70%. El silenciamiento fue realizado con un medio Opti-MEM (Life Technologies, USA) complementado con 2% de suero fetal bovino SFB y solución de antibióticos (10000 UI/ml de penicilina, 10

mg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B). Las condiciones de transfección usadas fueron las recomendadas de la guía de aplicación de OriGene (tabla 3).

**Tabla 3.** Condiciones de transfección recomendadas de de la guía de aplicación de OriGene.

<b>Tipo de placa</b>	<b>Volumen final (µl)</b>	<b>Volumen ARNi (5.0 µM), (10 µM final)</b>	<b>siTran 1.0 (µl)</b>	<b>Opti-MEM (µl)</b>
<b>96 pocillos</b>	120	0.3	1.5	8.5
<b>6 pocillos</b>	2800	4	20	120

La cantidad de células sembrada el día anterior al silenciamiento fue de 4500 células/pocillo en las placas de 96 pocillos y 12500 células/pocillo en las placas de 6 pocillos (confluencia del 50-70%). Siguiendo las instrucciones del kit y los cálculos mostrados en la tabla 3 se transfectaron las células con cada uno de los tres ARNi específicos para SMPD1 o con el ARNi random y se incubaron las placas durante 24 horas en la incubadora (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad). El día después del silenciamiento se cambió el medio a las placas de 96 pocillos con medio normal de crecimiento (10% de SFB, solución de antibióticos con 10000 UI/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B, 1% de aminoácidos no esenciales y 11 mg/ml de piruvato) para eliminar el efecto tóxico del siTran y algunas horas más tarde se efectuó el tratamiento de las células en ausencia (control) o presencia de concentraciones crecientes de LPS (0.01/0.1/1 µg/ml) o esfingomielinasa (SMasa) bacteriana (0.1 U/ml; Bacillus cereus). Aproximadamente 48 horas después del silenciamiento se recogió el sobrenadante de los pocillos para medir posteriormente la IL-6 mediante ELISA y se midió la actividad metabólica de las células mediante el ensayo del MTT, comparando los datos respecto al random. Las placas de 6 pocillos fueron usadas para verificar que el silenciamiento hubiera funcionado mediante una PCR cuantitativa en tiempo real. Para ello, 24 horas después del silenciamiento se cambió el medio con nuevo medio Opti-MEM y 48 horas después se lavaron las células dos veces con solución HANK'S y se congelaron a -80°C hasta el uso. Posteriormente se aisló el ARN total de las células mediante RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen,



Hilden, Germany), usando una solución de lisis y los reactivos del kit. El ADN codificante (ADNc) se obtuvo mediante transcripción inversa de 300 ng del ARN, siguiendo el protocolo del kit iScript de síntesis de ADNc (BioRad, Hemel Hempstead, UK). Las muestras de ADNc se amplificaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real que se realizó usando el sistema Taqman (TaqMan PCR Master mix, Applied biosystems) en la unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, empleando cebadores sentido y antisentido específicos contra las secuencias del gen *Smpd1* que codifica para la aSMasa (tabla 4). Los resultados se normalizaron respecto a la GAPDH y expresaron como % respecto al control negativo random. La descripción detallada del aislamiento del ARN, de la transcripción inversa y de la amplificación mediante PCR se encuentra en la sección 11 (ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA).

## **8. MEDIDA DE PROTEÍNAS (MÉTODO LOWRY)**

Para determinar la concentración de proteínas totales de las muestras (tejido de pulmón y LBA), se usó un ensayo colorimétrico que sigue el método de Lowry. Tal ensayo consiste en la adición de una sustancia química que es capaz de reaccionar con determinados residuos aminoacídicos. El resultado de estas reacciones es el cambio de color en la solución, que es cuantificado mediante una medida de absorbancia a 750 nm. Posteriormente, para determinar la concentración de proteínas totales de la muestra, al analizar los resultados de absorbancia, se interpola a una curva de calibración construida utilizando una proteína estándar, la BSA, cuya concentración es conocida. Para realizar tal medida se usó una solución alcalina de tartrato de cobre (Reactivo A, Bio-Rad, USA), el reactivo folin diluido (Reactivo B, Bio-Rad, USA) y una solución surfactante (Reactivo S, Bio-Rad, USA). Para trazar la curva de referencia se emplearon 12 concentraciones de BSA que variaron de 0 a 0.8 mg/ml de proteína y estaban preparadas con el mismo tampón de homogeneización de la muestra. Las diluciones de BSA y las muestras sin diluir (LBA del modelo de LPS y shock) o diluidas con la solución de homogeneización usada (1:5 o 1:10 en el LBA del modelo de shock; 1:10 y 1:20 en pulmón del modelo de LPS; 1:5, 1:10 y 1:25 en pulmón del modelo de shock) se colocaron por triplicado y por duplicado, respectivamente, en una placa de 96 pocillos. A continuación se añadió el Reactivo A+S (20 µl del reactivo S/ml de reactivo A) en proporción 1:1 y finalmente el reactivo B (80% del volumen final). Después de una

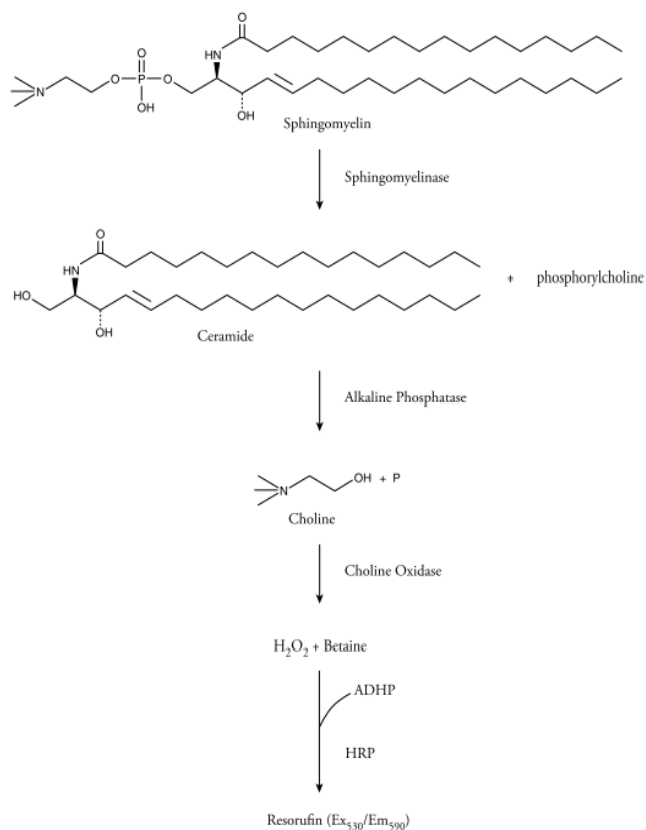
incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, se leyó la placa a 750 nm y determinó la concentración de proteínas en las muestras mediante la interpolación de los valores de absorbancia con los obtenidos en la recta patrón.

## **9. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD MIELOPEROXIDASA (MPO)**

Se realizó en homogenizado de pulmón utilizando un tampón fosfato (composición:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH=6) a una proporción de 500  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato por cada 0.1 g de pulmón. Después de una centrifugación a 13000 rpm a 4°C durante 20 minutos, el pellet se resuspendió en 300  $\mu\text{l}$  del buffer conteniendo CTAB 0.5% (bromuro de cetiltrimetilamonio) y, a continuación, se repitió tres veces un ciclo de homogenización, sonicación (20 segundos), congelación en  $\text{N}_2$  líquido y descongelación a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos, se recogió el sobrenadante y se determinó la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) mediante medidas espectrofotométricas durante 12 min a 450 nm (10  $\mu\text{l}$  de muestra con 100  $\mu\text{l}$  solución conteniendo 0.167 mg/ml de O-dianisidina dihidroclorhidrato y 0.0006%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). La actividad de la MPO se evaluó sobre una cantidad total de proteínas de 4  $\mu\text{g}$  por cada muestra y se expresó como porcentaje respecto al control [Moral-Sanz et al., 2012].

## **10. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA ESFINGOMIELINASA ÁCIDA (aSMasa)**

Se emplearon kits comerciales basados en un ensayo fluorimétrico (Cayman) (figura 11). Se determinó en homogenizado de pulmón usando la solución de aSMasa incluida en el kit (acetato de sodio 50 mM, pH=5), según la relación 0.01 g de pulmón en 100  $\mu\text{l}$  de la solución de aSMasa. Después de una incubación en hielo durante 15 minutos, los homogenizados se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C durante 10 minutos. A continuación, el sobrenadante se recogió, sonicoó durante 5 segundos y se siguió el protocolo del kit para determinar la actividad de la aSMasa mediante lecturas a 535 nm y 590 nm en el fluorómetro Varioskan (una lectura cada 30 segundos por un total de 30 minutos). La actividad se determinó en un total de proteínas de 45.7  $\mu\text{g}$  (modelo de LPS) o 35.7  $\mu\text{g}$  (modelo de shock) y se expresó como porcentaje respecto al control [von Bismarck et al., 2008].



**Figura 11.** Esquema del ensayo fluorimétrico para medir la actividad de aSMasa.

## 11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Los estudios de expresión génica que se presentan en este trabajo se han realizado mediante RT-PCR (Transcripción Inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa). Esta técnica de gran sensibilidad nos permite comparar entre distintos grupos experimentales los niveles de expresión de pequeñas cantidades de ARNm. El aislamiento del ARN total a partir de CMLVAP de rata con aSMasa silenciada o del ADN a partir del plasma de rata para determinar la translocación bacteriana (modelo de shock hemorrágico traumático) se realizó mediante RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), respectivamente. El lisado celular y el plasma añadido a la solución del kit se centrifugó a 10000g o 6000g durante 3-1 minutos respectivamente. El sobrenadante o el plasma+buffer se mezcló con un volumen igual de etanol al 70% provocando la precipitación del ARN o ADN, el cual se retenía y purificaba en las columnas proporcionadas en el kit siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Finalmente, el ARN o el ADN se disolvió en citrato de sodio (pH=6.4) y se mantuvo a  $-80^{\circ}C$ . La concentración del ARN o ADN purificado se midió mediante

determinación espectrofotométrica a 260 nm usando el equipo NanoDrop 1000 (Thermo scientific, USA). El ADNc derivado de CMLVAP de rata se obtuvo mediante transcripción inversa de 300 ng de ARN, siguiendo el protocolo del kit iScript de síntesis de ADNc (BioRad, Hemel Hempstead, UK). Las muestras de ADN se amplificaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real que se realizó usando el sistema Taqman (TaqMan PCR Master mix, Applied biosystems) en la unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, empleando cebadores sentido y antisentido específicos contra las secuencias de los productos que se citan a continuación (tabla 4). Los resultados se normalizaron respecto a la expresión de GAPDH. La determinación de la translocación bacteriana fue realizada a través de una sonda y cebadores sentido y antisentido específicos para el gen 16 S rADN (tabla 4). La sonda y los cebadores se basan en regiones de identidad dentro del gen 16 S rADN derivadas de la alineación de las secuencias de la mayoría de los grupos de bacterias [Nadkarni et al., 2002]. El ADN de *E. Coli* se usó como control positivo.

**Tabla 4.** *Secuencias de los cebadores y de la sonda empleados en esta Tesis Doctoral.*

	<b>Secuencia 5'-3'</b>
<b>aSMasa</b>	Cebador comercial de Applied Biosystems con referencia Rn01506464_g1
<b>GAPDH</b>	Cebador comercial de Applied Biosystems con referencia Rn01775763_g1
<b>16 S rADN</b>	Sentido TCCTACGGGAGGCAGCAGT Antisentido GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT Sonda (6-FAM)-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-(TAMRA)

## 12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

Para el análisis de la expresión proteica se usaron pulmones de rata derivados de los modelos animales, que fueron homogenizados en un tampón de homogenización, cuya composición es: Trizma® Pre-set crystals con pH 7.5 (Sigma, España), DL-ditiotreitol (DTT) 1M (Sigma, España), un agente surfactante, NP40 1% (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y una batería de inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail

tablets, Roche Diagnostics GmbH, Alemania). El homogeneizado resultante se mantuvo 30 minutos en hielo y posteriormente fue centrifugado a 4°C, a una velocidad de 10000 rpm durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración proteica mediante el método de Lowry.

Se utilizó la técnica del Western Blot para la separación de las proteínas (20-25 µg) mediante una electroforesis SDS-PAGE (a temperatura ambiente y 90 V) siguiendo el método de Laemmli en un sistema de mini-geles (Bio-Rad) de acrilamida (9-10%). Se hirvió una cantidad igual de proteínas de cada muestra a 99°C durante 5 minutos y posteriormente se cargó en el gel de acrilamida. Después de la electroforesis, las proteínas fueron trasferidas a membranas de polivinildifluoruro (PVDF) durante dos horas a 400 mA en hielo. A continuación, las membranas fueran tratadas con una solución de leche libre de grasa al 5% p/v para el bloqueo de uniones inespecíficas y posteriormente se incubaron con el correspondiente anticuerpo primario (tabla 5A) durante toda la noche a 4°C. El día siguiente, después de una serie de lavados en T-TBS (NaCl 0.5M, Tris pH 7.5 0.02M, tween 20 0.1% y agua milliQ) se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (tabla 5B).

**Tabla 5.** Características de los anticuerpos primarios (A) y secundarios (B) empleados en esta Tesis Doctoral.

**A)**

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial
Anti-aSMasa	Cabra	1:1000 en leche 5% p/v	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GAPDH	Ratón	1:10000 en leche 5% p/v	Sigma-Aldrich

**B)**

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial
Anti-Cabra	Conejo	1:30000 en BSA 1% p/v	Sigma-Aldrich
Anti-Ratón	Cabra	1:10000 en leche 1% p/v	Calbiochem

Después de 4 lavados en T-TBS y un último en TBS (NaCl 0.5 M, Tris pH 7.5 0.02 M y agua milliQ) las bandas se visualizaron mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, UK; SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA) y se cuantificaron utilizando un programa de análisis densitométrico de imagen (Quantity One, Bio-Rad Laboratories). Los valores de cada banda de la proteína en estudio fueron corregidos por los valores obtenidos de la banda de una proteína control (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, GAPDH) y expresados como porcentaje de los valores controles.

### 13. HISTOLOGÍA

Los pulmones derivados de los modelos animales fueron fijados con formol al 4% y embebidos en parafina para su posterior procesamiento en cortes de 1 mm de grosor. Los cortes fueron fotografiados y analizados mediante ImageJ (versión 1.42, National Institute of Health, USA). Sistemáticamente el pulmón izquierdo (modelo de instilación intratraqueal de LPS) o derecho (modelo de shock hemorrágico traumático) de cada animal se fijaba *in situ* por medio de una inyección de formol a través de la tráquea y, a continuación, se incluía en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes que fueron teñidos con hematoxilina/eosina para su análisis. El tamaño del edema localizado alrededor de los vasos sanguíneos se analizó mediante el programa informático ImageJ (versión 1.42, National Institute of Health, USA), restando el diámetro interior del edema, que corresponde al diámetro del vaso mismo, al diámetro exterior del edema. Se calculó también el % del área del edema en función del tamaño del vaso (area edema/diámetro vaso x 100). Para determinar el número de células inmunes se usó el programa informático ImageJ.

### 14. REACTIVOS

Todos los fármacos se obtuvieron de Sigma (España) excepto: desipramina (Tocris, UK), D609 (Santa Cruz Biotechnology, USA), TAK-242 (Calbiochem, Alemania), el anticuerpo primario de ratón anti-ceramida (MID 15B4 Enzo Life Sciences, Francia), el anticuerpo secundario de oveja conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd., UK). Los fármacos fueron disueltos en agua

desionizada excepto el D609, la dexametasona y el TAK-242 que fueron disueltos en DMSO. La concentración del vehículo DMSO fue  $\leq 0.1\%$ .

## **15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

En todos los grupos experimentales se analizó si los datos se ajustaban a una distribución normal mediante el test de normalidad de D'Agostino-Pearson y cuando los datos tenían una distribución gaussiana se analizaron los resultados mediante pruebas paramétricas y se representaron mediante la media  $\pm$  el error estándar de la media (e.e.m.) para un determinado número de anillos de arterias pulmonares o células o muestras (n) de distintos animales. En caso contrario, los datos fueron analizados mediante pruebas no paramétricas y expresados como medianas en un diagrama de caja y bigotes. Los resultados experimentales se analizaron comparando las medias mediante la prueba t de student para muestras pareadas, no pareadas o ANOVA de una vía o dos vías seguido de un test post hoc de Dunnett o Bonferroni para observaciones múltiples. En el caso de datos no paramétricos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguido del test de comparación múltiple de Dunn. Los gráficos de supervivencia se construyeron de acuerdo con el método de Kaplan-Meier y se utilizó la prueba de log-rank para comparar curvas. En todos los casos se consideró un valor de  $P < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## **RESULTADOS**





## **1. PAPEL DE LA ESFINGOMIELINASA ÁCIDA Y DE LA IL-6 EN EL MODELO DE DPA INDUCIDO POR LPS**

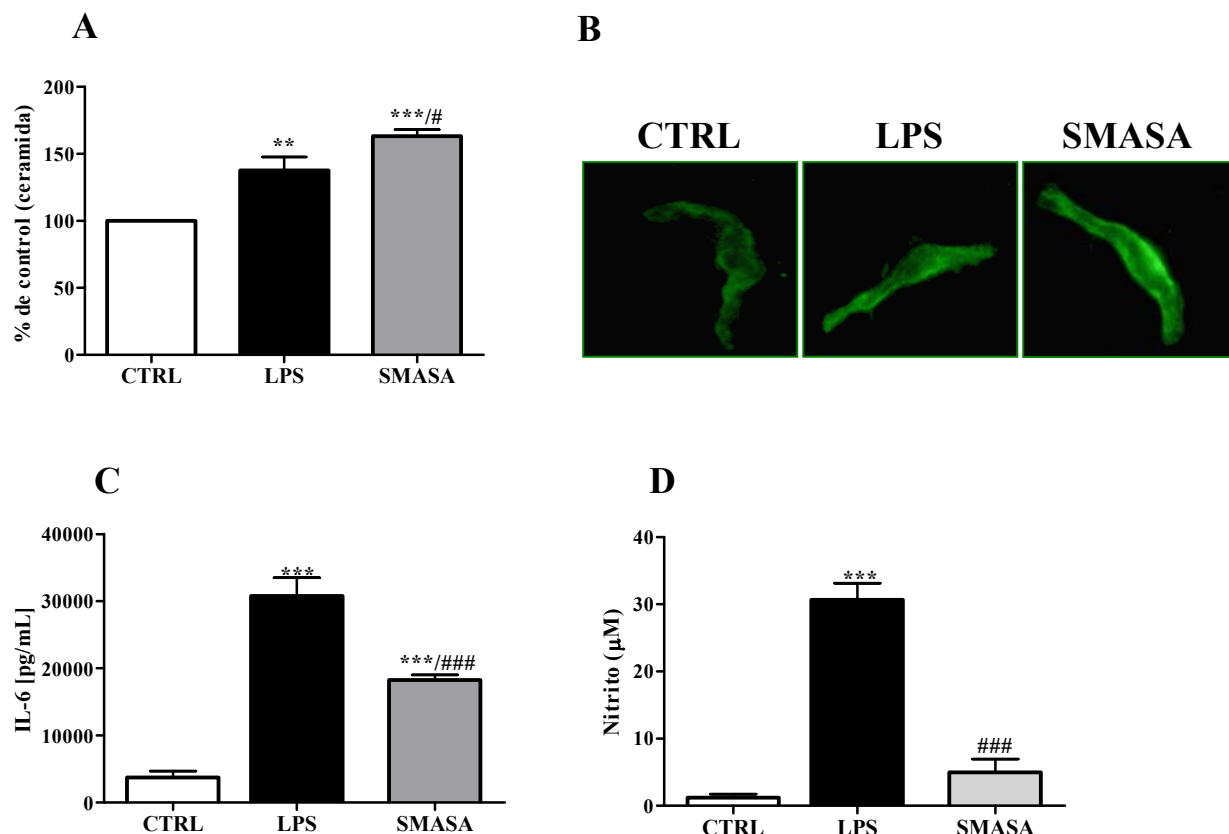
### **1.1. Efectos del LPS y de la SMasa exógena sobre la producción de ceramida, IL-6 y nitrito *in vitro***

La exposición a LPS indujo un aumento en la producción de ceramida e IL-6 en las CMLVAP y de nitrito en anillos de AP de rata (figura 12). De forma similar, la SMasa exógena, enzima que degrada la esfingomielina, liberando ceramida y fosfocolina, aumentó los niveles de ceramida y de IL-6 en las CMLVAP de rata pero no afectó de forma significativa la producción de nitrito en las AP de rata.

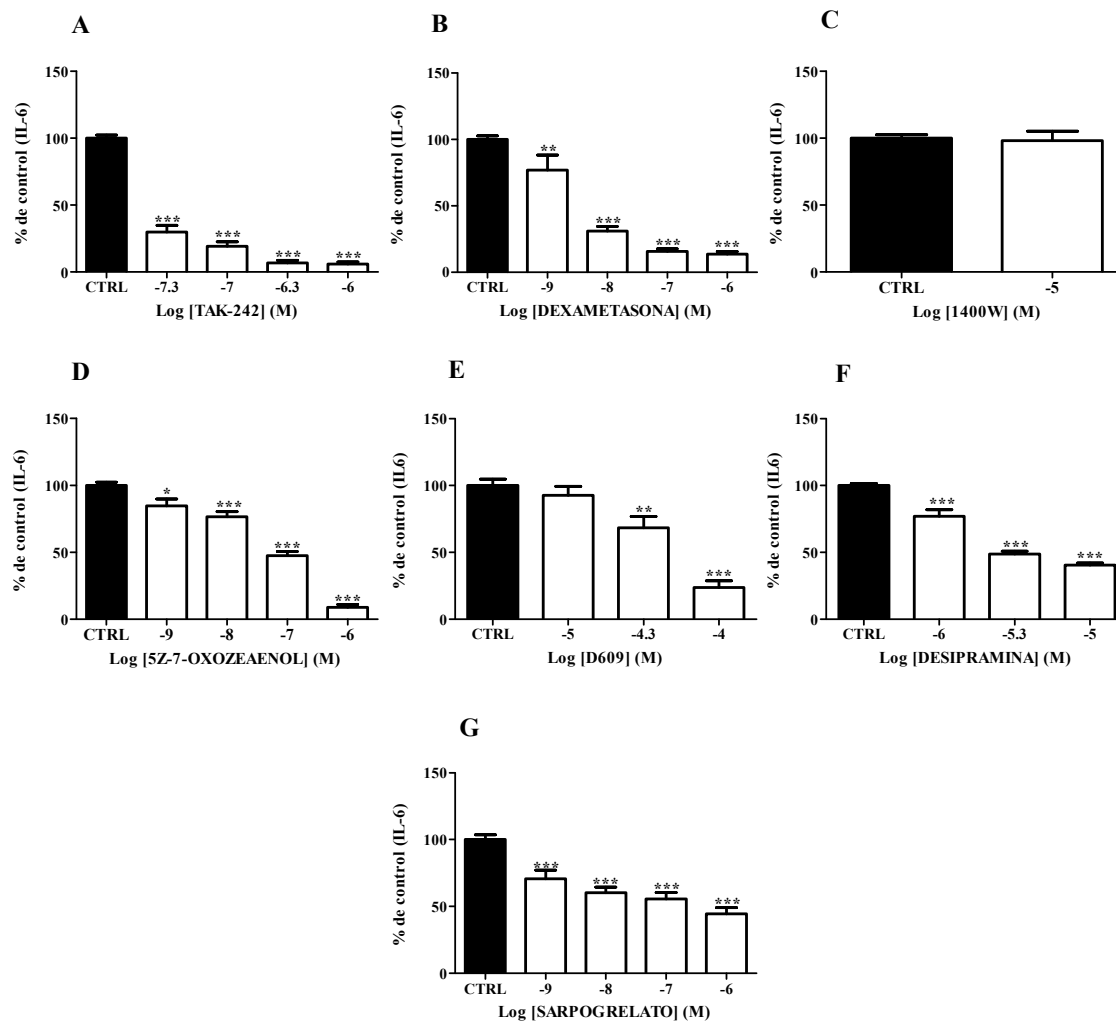
Puesto que estos resultados sugieren que la producción de ceramida podría modular la inflamación vascular y podría ser activada por el LPS *in vitro*, decidimos caracterizar el posible papel de la vía SMasa-ceramida en la respuesta inflamatoria vascular y disfunción vascular pulmonar inducida por endotoxina *in vitro*.

#### **1.1.1. Regulación de la producción de la IL-6 en células de músculo liso vascular de arteria pulmonar**

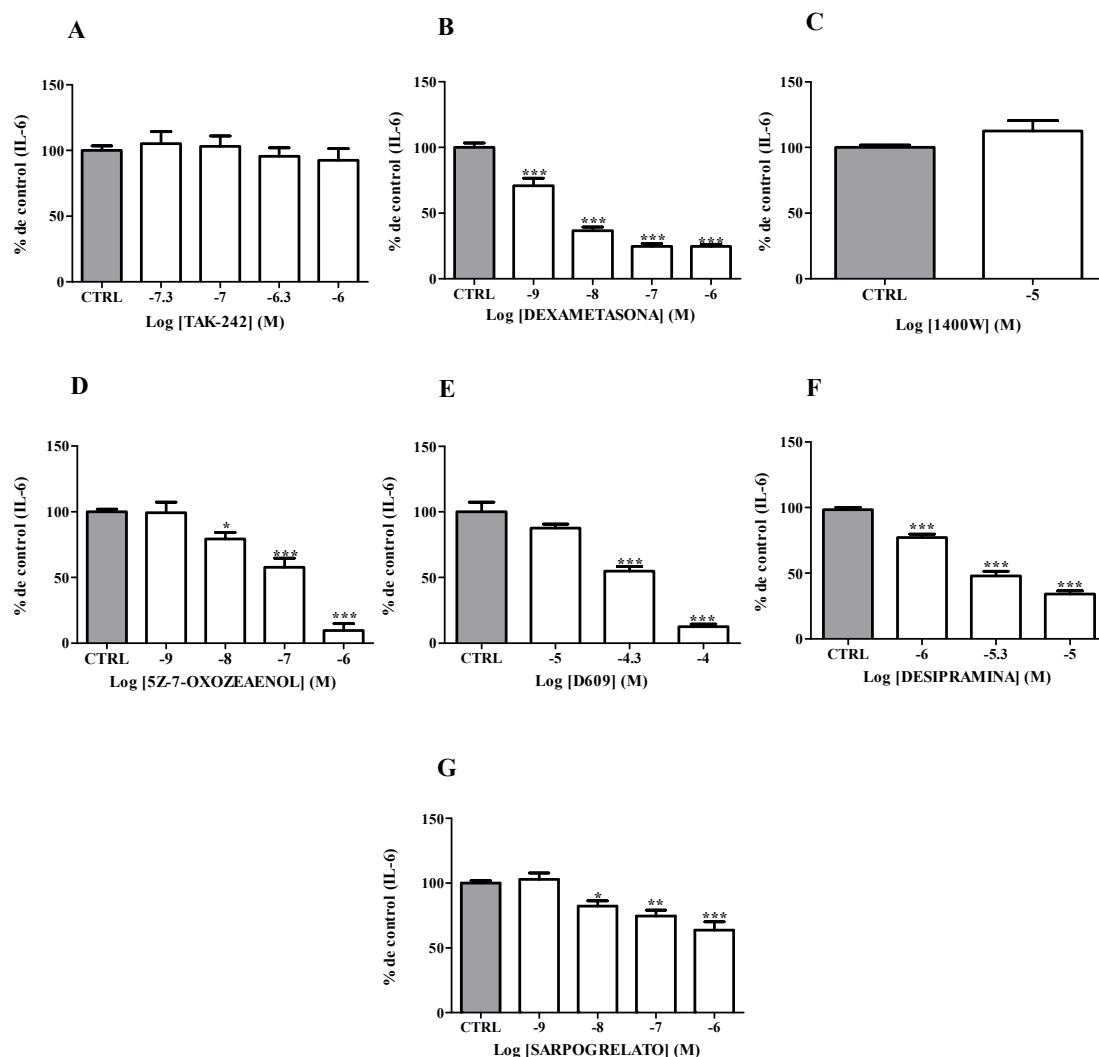
Tal y como muestra la figura 13, el aumento en la producción de IL-6 inducido por LPS se inhibió de forma dependiente de concentración por el antagonista del receptor TLR4 TAK-242 (A), el glucocorticoide dexametasona (B), el inhibidor de TAK-1 5z-7-oxozeaenol (D), los inhibidores de aSMasa D609 (E) y desipramina (F) y el antagonista de los receptores de la serotonina 5HT<sub>2A</sub> sarpogrelato (G). En cambio, la concentración de IL-6 no se modificó tras el tratamiento con el inhibidor de iNOS 1400W (C).



**Figura 12. Efectos del LPS y de la SMasa exógena sobre la producción de ceramida, IL-6 y nitrito.** Variación en los niveles de ceramida (A) y de IL-6 (C) en CMLVAP y de la producción de nitrito (D) en AP de rata incubados en condiciones control (CTRL) o en presencia de LPS (1μg/ml) o SMasa exógena (0.1 U/ml). En el panel (B) se muestran 3 fotos representativas de CMLVAP de rata obtenidas mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-ceramida. Cada columna representa la media  $\pm$  e.e.m (ceramida e IL-6:  $n=2-6$ ; nitrito  $n=8-23$  anillos de AP de 4-20 ratas diferentes). \*\* y \*\*\* indican  $p<0.01$  y  $p<0.001$  frente a control, # y ### indican  $p<0.05$  y  $p<0.001$  frente a LPS (ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni).



**Figura 13.** Efecto de diferentes inhibidores farmacológicos sobre la producción de IL-6 inducida por el LPS en las CMLVAP de rata. Efectos del antagonista del receptor TLR4 TAK-242 (A), del glucocorticoide dexametasona (B), del inhibidor de iNOS 1400W (C), del inhibidor de TAK-1 5z-7-oxozeaenol (D), de los inhibidores de aSmase D609 (E) y desipramina (F) y del antagonista de los receptores de la serotonina 5HT<sub>2A</sub> sarpogrelato (G). Cada columna representa la media  $\pm$  e.e.m. (n=2-12 experimentos, cada experimento se realizó por triplicado). \*, \*\* y \*\*\* indican  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  respectivamente, frente a LPS control (t de student o ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Dunnett según corresponda).

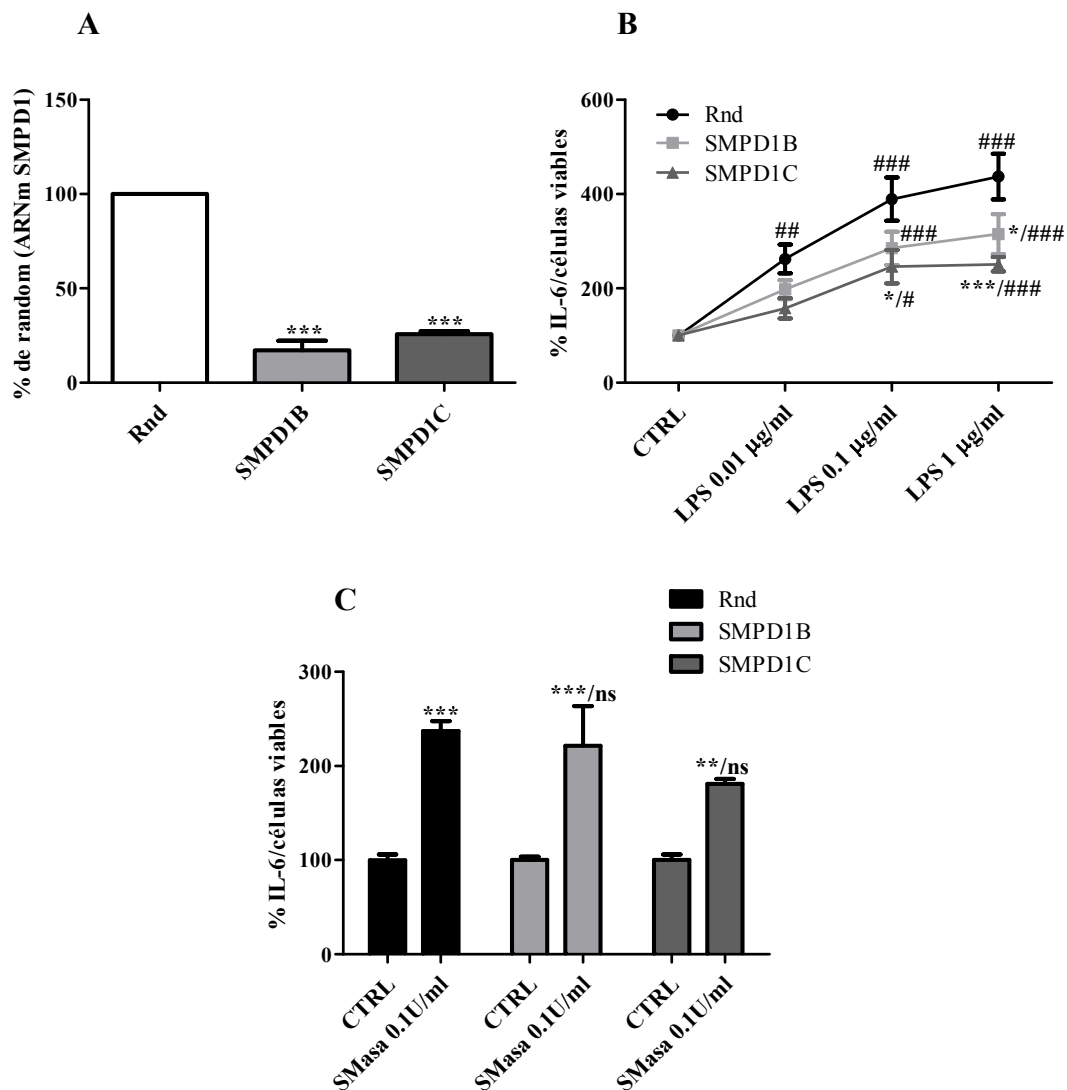


**Figura 14.** Efectos de diferentes inhibidores farmacológicos sobre la producción de IL-6 inducida por la SMasa en las CMLVAP de rata. Efectos de TAK-242 (A), dexametasona (B), 1400W (C), 5z-7-oxozeaenol (D), D609 (E) y desipramina (F) y sarpogrelato (G). Cada columna representa la media  $\pm$  e.e.m. ( $n=3-10$  experimentos, cada experimento por triplicado). \*, \*\* y \*\*\* indican  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  y  $p<0.001$  respectivamente, frente a SMasa control (*t* de student o ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Dunnett según corresponda).

Asimismo, la liberación de IL-6 inducida por la SMasa exógena presentó una sensibilidad similar a la estimulada por el LPS puesto que fue insensible al inhibidor de iNOS 1400W y sensible al glucocorticoide dexametasona, al inhibidor de TAK1, al inhibidor de los receptores de serotonina 5HT<sub>2A</sub> y a los inhibidores de la aSMasa D609 y desipramina (figuras 14A-G). La potencia de estos fármacos fue similar para inhibir la respuesta de LPS y de SMasa (figuras 13 y 14). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en las células estimuladas con LPS, la producción de IL-6 tras la exposición a SMasa exógena no se vio modificada por el antagonista TAK242 lo que sugiere que los efectos de la SMasa exógena sobre la IL-6 son independientes de TLR4.

### **1.1.2. Efectos del silenciamiento de la esfingomielinasa ácida en células de músculo liso vascular de arteria pulmonar de rata**

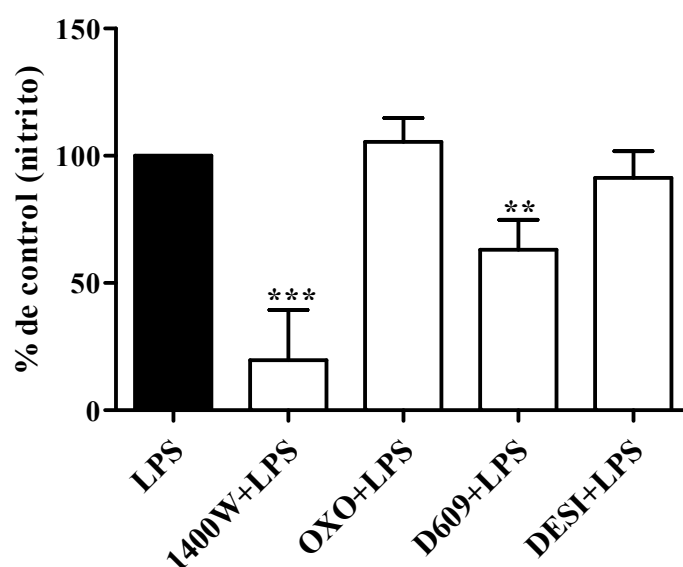
Puesto que los resultados obtenidos empleando inhibidores farmacológicos sugerían que la activación de la aSMasa estaba implicada en la vía de señalización inducida por el LPS y que modula la producción de IL-6 en AP de rata, decidimos confirmar estos datos silenciando la expresión del gen que codifica para la enzima aSMasa (SMPD1) en las CMLVAP de rata. Se utilizaron dos tipos de moléculas pequeñas de ARN de interferencia (ARNi) específicas (en inglés *small interfering RNA*) para el gen SMPD1 (SMPD1C y SMPD1B) y un control negativo (RNAi random, rnd) en las CMLVAP de rata. La figura 15A muestra que ambos ARNi redujeron la expresión del gen de la aSMasa (un 80% en el caso de SMPD1B y un 75% el SMPD1C). Además, la reducción en los niveles de expresión de la aSMasa inhibió significativamente el aumento de IL-6 inducido por el LPS, (figura 15B), pero no modificó de forma significativa los efectos inducidos por la SMasa exógena (figura 15C) confirmando los datos *in vitro* anteriores y el papel de la aSMasa en los efectos del LPS sobre la producción de IL-6.



**Figura 15. Silenciamiento de la aSMasa.** (A) Efectos de los ARNi sobre la expresión del ARNm de SMPD1. Variación en los niveles de IL-6 tras el tratamiento con (B) LPS (0.01/0.1/1 µg/ml) y (C) SMasa exógena (0.1 U/ml). Los valores de IL-6 están corregidos por el número de células viables. Los resultados están expresados como los valores medios  $\pm$  e.e.m. ( $n=3-4$  experimentos, cada uno por triplicado). \*/#, \*\*/## y \*\*\*/### indican  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  y  $p<0.001$  respectivamente, frente a random/control de cada grupo (Fig.A: ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Dunnett; Fig. B: ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni). En la gráfica (C), \*\* y \*\*\* indican  $p<0.01$  y  $p<0.001$  frente a control de cada grupo y ns indica la no significatividad frente a SMasa random (ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni).

### 1.1.3. Variación de la producción de nitrito en anillos de arterias pulmonares de rata

Puesto que los datos obtenidos *in vitro* demostraron que la aSMasa modulaba la producción de IL-6 inducida por el LPS en las CMLVAP de rata mediante un mecanismo que parecía ser independiente de iNOS, decidimos analizar la concentración de nitrito en anillos de AP de rata, para ver si había algún tipo de interacción entre la vía de la iNOS y la de la aSMasa. La figura 16 muestra que mientras el 1400W redujo aproximadamente de un 80% los niveles de nitritos liberados al medio por las AP de rata, el 5z-7-oxozeaenol no afectó el aumento de nitrito producido por LPS. Por el contrario, los inhibidores farmacológicos de la aSMasa D609 y desipramina dieron resultados contradictorios puesto que mientras que la desipramina no tuvo ningún efecto significativo, el D609 redujo de manera parcial pero significativa los niveles de nitritos inducidos por el LPS.



**Figura 16. Papel de la aSMasa y TAK-1 en la producción de nitritos inducida por el LPS en AP de rata.** Variación en la acumulación de nitritos inducida por LPS tras el tratamiento con 1400W ( $10^{-4}M$ ), 5z-7-oxozeaenol (OXO;  $10^{-7}M$ ), D609 ( $10^{-4}M$ ) y desipramina (DESI;  $10^{-5}M$ ) en anillos de AP de rata. Cada columna representa la media  $\pm$  e.e.m. ( $n=3-23$  de 3-20 ratas diferentes). \*\* y \*\*\* indican  $p<0.01$  y  $p<0.001$  frente a LPS control (ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Dunnett).



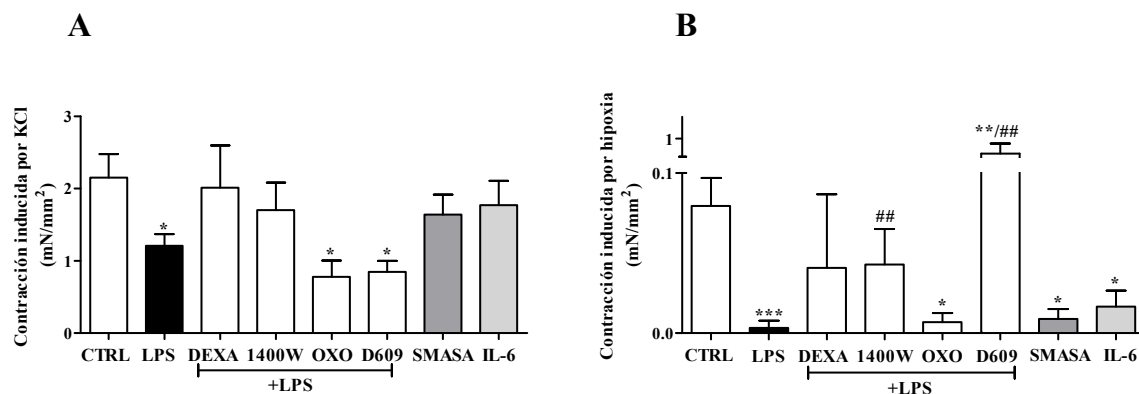
## **1.2. Efectos del LPS, de la SMasa exógena y de la IL-6 sobre la contractilidad y la disfunción endotelial en arterias pulmonares de resistencia de rata**

A continuación, se analizaron los efectos del LPS y de la aSMasa sobre la reactividad vascular de AP de resistencia de rata. Se analizó la contractilidad de las AP de resistencia en respuesta a KCl, hipoxia y diferentes vasoconstrictores (5-HT y Phe), y la función endotelial, realizando curvas a ACh en anillos de AP precontraídos con 5-HT.

### **1.2.1. Caracterización de la respuesta contráctil**

#### **1.2.1.1. Respuesta a KCl e hipoxia**

Los anillos de AP de resistencia de ratas fueron estimulados con KCl 80 mM para obtener una contracción que sirvió como referencia de la capacidad contráctil de las arterias. Además, para determinar la respuesta de los vasos a la exposición aguda de hipoxia, se burbujearon los canales con una mezcla de 95%N<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> durante 15 minutos dos veces, dejando 30 minutos de normoxia entre los dos periodos de hipoxia, y se confirmó que la respuesta a la hipoxia era reproducible. Los datos se expresaron como valores de fuerza contráctil corregidos por la superficie del vaso (mN/mm<sup>2</sup>). Los resultados demostraron que el LPS reducía significativamente tanto la contracción inducida por KCl como la vasoconstricción pulmonar hipóxica en los anillos de AP. La incubación de las AP con dexametasona (10<sup>-6</sup> M) y 1400W (10<sup>-4</sup> M) previno tanto la hiporrespuesta a los niveles elevados de potasio como a la exposición aguda a hipoxia mientras que el 5z-7-oxozeaenol (10<sup>-7</sup> M) no fue capaz de prevenir estas alteraciones (figuras 17A, B). Por el contrario, aunque los anillos tratados con D609 presentaron una reducción en la contracción inducida por KCl, tanto en condiciones control (tabla 6) como tras el tratamiento con LPS (figura 17A), el D609 produjo una hiperrespuesta a hipoxia (figura 17B). Por último, se observó que aunque la SMasa exógena y la IL-6 no modificaron la capacidad de los vasos aislados para contraer a KCl, estos dos factores inhibieron significativamente la vasoconstricción hipóxica (figura 17B), reproduciendo los efectos del LPS.



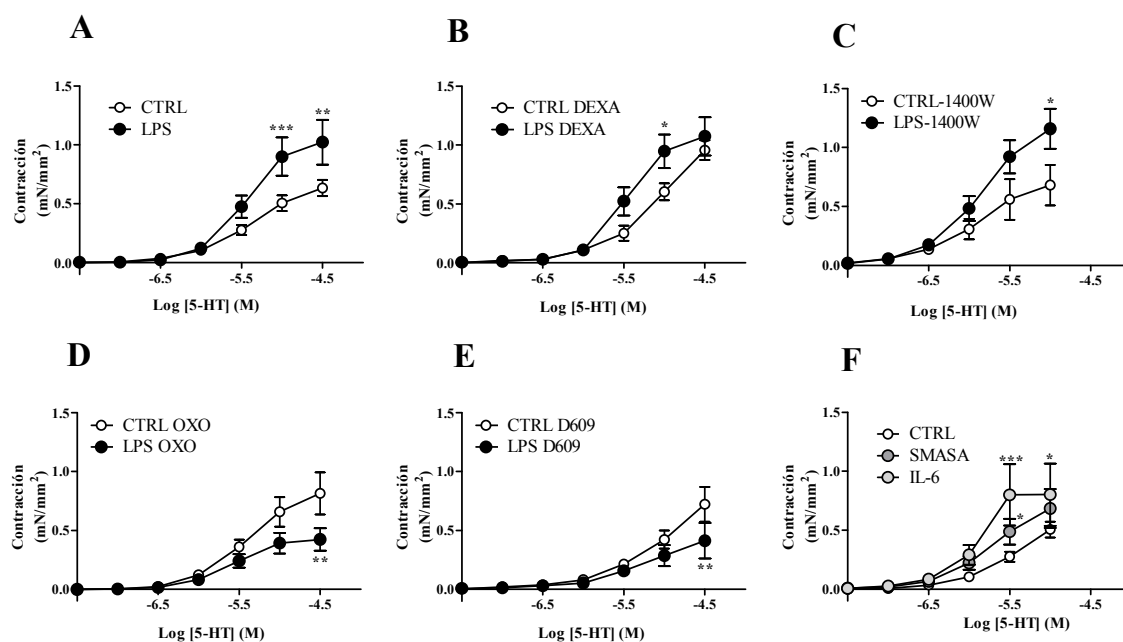
**Figura 17. Determinación de la respuesta contráctil.** Contracción de las AP de rata a KCl (80 mM; A) e hipoxia (B) tras incubación de 24 horas con solo medio (CTRL), LPS (1 µg/ml), LPS-dexametasona (DEXA; 10<sup>-6</sup> M), LPS-1400W (10<sup>-4</sup> M), LPS-5z-7-oxozeaenol (OXO; 10<sup>-7</sup> M), LPS-D609 (10<sup>-4</sup> M), SMasa (0.001 U/ml) e IL-6 recombinante (30 ng/ml). Cada columna representa la media ± e.e.m. (n=5-52 de 4-42 ratas diferentes). \* y \*\* indican p<0.05 y p<0.01 frente a control, ## indica p<0.01 frente a LPS (prueba t de student).

**Tabla 6. Determinación de la respuesta contráctil a KCl e hipoxia.** Contracción de los anillos de AP de rata a KCl (80 mM) e hipoxia tras la incubación durante 24 horas en ausencia (CTRL) o presencia de dexametasona (DEXA; 10<sup>-6</sup> M), 1400W (10<sup>-4</sup> M), 5z-7-oxozeaenol (OXO; 10<sup>-7</sup> M) y D609 (10<sup>-4</sup> M). Los datos están expresados como media ± e.e.m. (n=5-52 de 4-39 ratas diferentes) y analizados mediante la prueba t de student.

	Contracción a KCl (mN/mm <sup>2</sup> )	Contracción a hipoxia (mN/mm <sup>2</sup> )
<b>CTRL</b>	2.148±0.3269	0.07949±0.01755
<b>CTRL+DEXA 10<sup>-6</sup> M</b>	3.549±1.170	0.1352±0.07743
<b>CTRL+1400W 10<sup>-4</sup> M</b>	1.754±0.2823	0.03346±0.01448
<b>CTRL+OXO 10<sup>-7</sup> M</b>	1.884±0.5519	0.07397±0.03432
<b>CTRL+D609 10<sup>-4</sup> M</b>	1.086±0.1677	0.1420±0.06802

### 1.2.1.2. Respuesta a serotonina

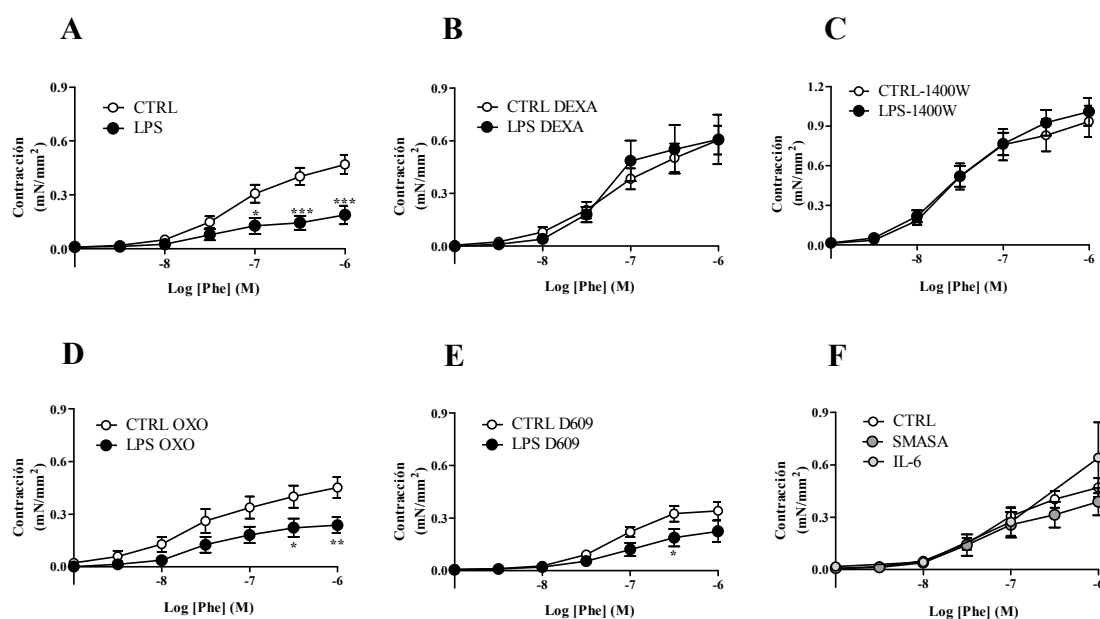
La estimulación de las AP de resistencia de rata con serotonina ( $3 \times 10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) indujo una respuesta contráctil de forma concentración dependiente. La figura 18 muestra que el LPS inducía una hiperrespuesta a serotonina (A) que es parcialmente sensible a dexametasona (B), insensible a 1400W (C) y que fue revertida por el 5z-7-oxozeaenol (D) y el D609 (E). Cabe destacar que tanto el 5z-7-oxozeaenol como el D609 no solo previnieron la hiperrespuesta inducida por el LPS sino que generaron una hiporrespuesta, resultando significativamente diferentes del control. Al contrario, el 1400W no inhibió el aumento de la contracción en respuesta a serotonina inducida por el LPS (figura 18C). Por último, la IL-6 y la SMasa exógena indujeron también un aumento en la contracción en respuesta a 5-HT (figura 18F).



**Figura 18. Curvas concentración-respuesta a 5-HT en AP de rata.** (A) Contracción de AP incubadas 24 horas en ausencia (control; CTRL) o presencia de LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) con (B) dexametasona (DEXA;  $10^{-6}$  M), (C) 1400W ( $10^{-4}$  M), (D) 5z-7-oxozeaenol (OXO;  $10^{-7}$  M), (E) D609 ( $10^{-4}$  M). (F) Respuesta vasoconstrictora a 5-HT de AP incubadas 24 horas en ausencia (CTRL) o presencia de SMasa ( $0.001$  U/ml) o IL-6 ( $30$  ng/ml). Los resultados están expresados como los valores medios  $\pm$  e.e.m. (n=5-48 de 4-40 ratas diferentes). \*, \*\* y \*\*\* indican  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  respectivamente, frente al control (ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni).

### 1.2.1.3. Respuesta a fenilefrina

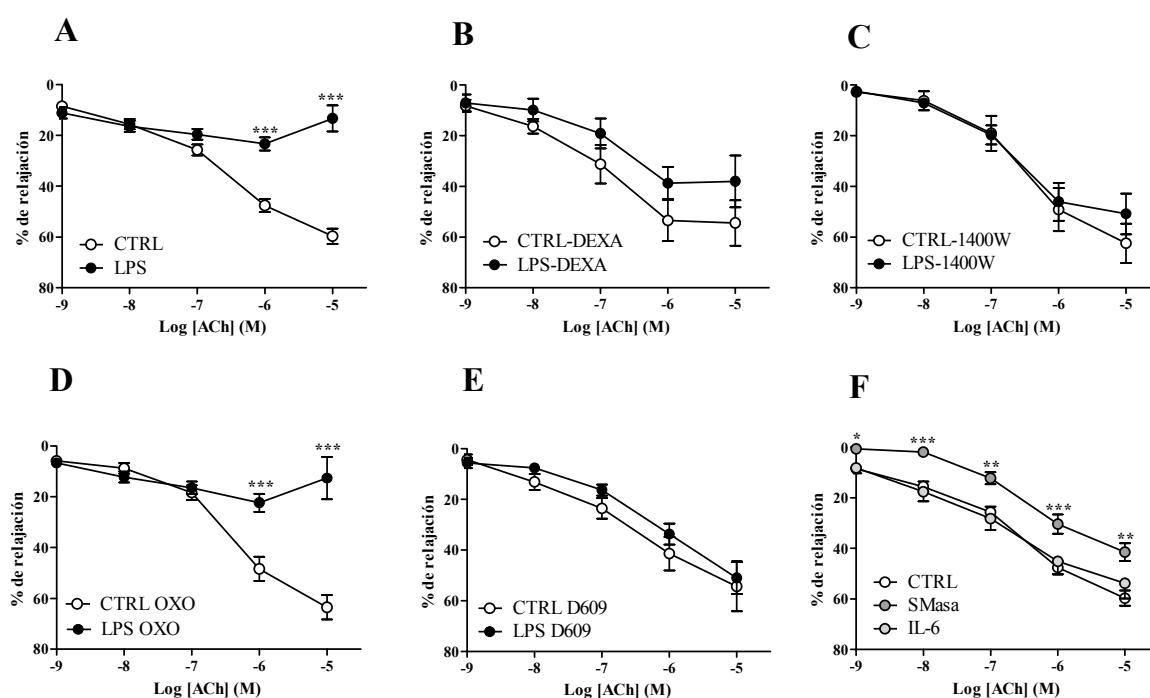
A continuación, se analizó la respuesta de las AP al agonista de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, fenilefrina. La figura 19 muestra que el LPS inducía una hiporrespuesta a fenilefrina, significativamente diferente del control a las concentraciones de  $10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M, que fue prevenida completamente por la dexametasona (B) y el 1400W (C) y parcialmente por el D609 (E). Por el contrario, la incubación con el 5z-7-oxozeaenol (D) no fue capaz de prevenir la hiporrespuesta a Phe inducida por el LPS. Cabe destacar que la incubación de las AP con 1400W y con dexametasona produjo una hiperrespuesta a Phe, llevando a valores de contracción superiores a los del control (figura 19B, C), mientras que el D609 redujo las respuestas contráctiles en condiciones control (figura 19E). Por último, ni la IL-6 ni la SMasa exógena afectaron de forma significativa la contracción a Phe (figura 19F).



**Figura 19. Curvas concentración-respuesta a Phe en AP de rata.** (A) Contracción de AP incubadas 24 horas en ausencia (CTRL) o presencia de LPS ( $1\mu\text{g/ml}$ ) con (B) dexametasona (DEXA;  $10^{-6}$  M), (C) 1400W ( $10^{-4}$  M), (D) 5z-7-oxozeaenol (OXO;  $10^{-7}$  M) y (E) D609 ( $10^{-4}$  M). (F) Respuesta vasoconstrictora a Phe de AP incubadas 24 horas en ausencia (CTRL) o presencia de SMasa ( $0.001$  U/ml) o IL-6 ( $30$  ng/ml). Los resultados están expresados como los valores medios  $\pm$  e.e.m. ( $n=5-35$  de 4-32 ratas diferentes). \* y \*\*\* indican  $p<0.05$  y  $p<0.001$  frente al control (ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni).

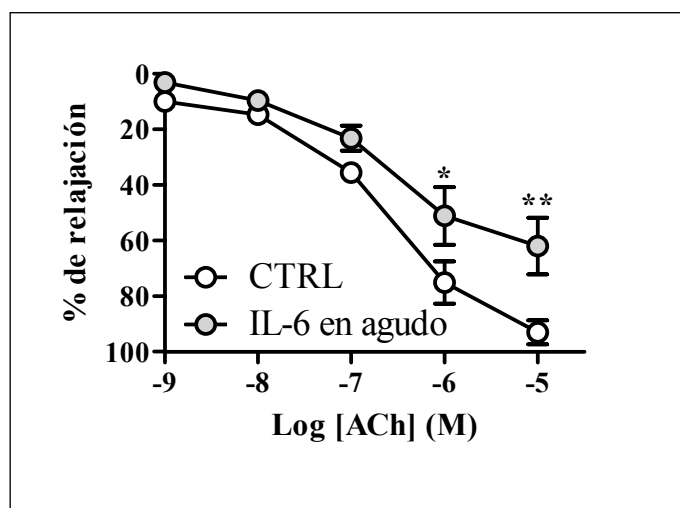
### 1.2.2. Caracterización de la función endotelial: respuesta a acetilcolina

La función endotelial se valoró analizando la respuesta a concentraciones crecientes de acetilcolina (ACh) en anillos de AP que fueron previamente contraídos con serotonina. Los resultados se expresaron como porcentaje de relajación respecto a la contracción máxima de serotonina. La figura 20 muestra que la incubación de las AP con LPS (A) inducía una marcada disfunción endotelial, que se prevenía por la dexametasona (B), el 1400W (C) y el D609 (E), pero no por el 5z-7-oxozeaenol (D). Por último, la SMasa, pero no la IL-6, reprodujo los efectos del LPS sobre la función endotelial (figura 20F).



**Figura 20. Curvas concentración-respuesta a ACh en AP de rata.** (A) Efectos relajantes de ACh sobre AP tratadas 24 horas en ausencia (control) o presencia de LPS ( $1\mu\text{g/ml}$ ) con (B) dexametasona (DEXA;  $10^{-6}$  M), (C) 1400W ( $10^{-4}$  M), (D) 5z-7-oxozeaenol (OXO;  $10^{-7}$  M) y (E) D609 ( $10^{-4}$  M). (F) Relajación a ACh de AP incubadas en ausencia (CTRL) o presencia de SMasa ( $0.001$  U/ml) o IL-6 ( $30$  ng/ml). Los resultados están expresados como los valores medios  $\pm$  e.e.m. ( $n=5-45$  de 2-40 ratas diferentes). \*, \*\* y \*\*\* indican  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  y  $p<0.001$  respectivamente, frente al control (ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni).

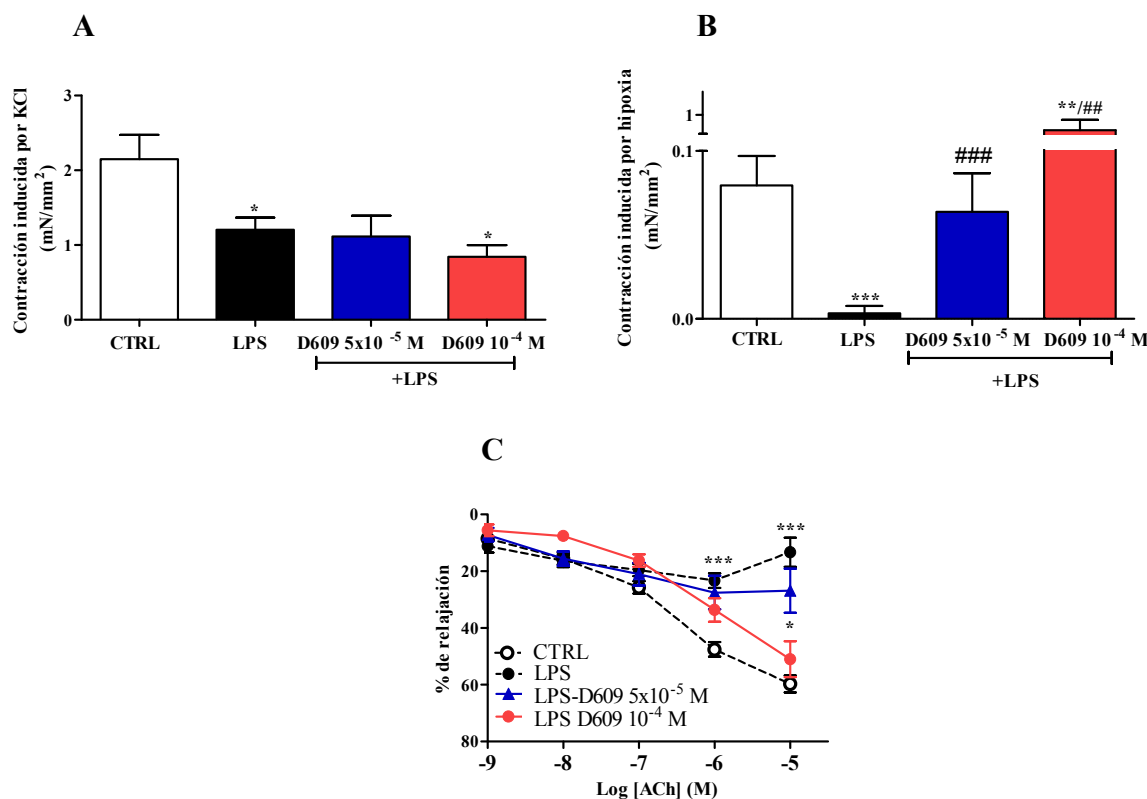
Puesto que la incubación durante 24 horas con IL-6 no alteró la función endotelial en las AP de resistencia, decidimos analizar los efectos de la exposición aguda (1h) a IL-6 (30 ng/ml). A diferencia de lo observado en el tratamiento crónico, la administración en agudo de la IL-6 redujo significativamente la relajación a ACh, produciendo disfunción endotelial (figura 21).



**Figura 21. Efectos de IL-6 en agudo sobre la disfunción endotelial.** Relajación a ACh de AP de resistencia de rata tras la exposición aguda a IL-6 (30 ng/ml). Los resultados están expresados como los valores medios  $\pm$  e.e.m. ( $n=4-5$  de 2 ratas diferentes). \* y \*\* indican  $p<0.05$  y  $p<0.01$  frente al control (ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni).

### 1.2.3. Dependencia de dosis en los efectos de D609 sobre la contractilidad y la disfunción endotelial en arterias pulmonares de resistencia de rata

Las AP de resistencia de rata fueron incubadas con dos concentraciones diferentes de D609 para analizar el efecto del fármaco sobre la contractilidad vascular y la disfunción endotelial en función de la concentración. Los resultados demostraron que los efectos del D609 sobre la contracción a KCl, la vasoconstricción pulmonar hipóxica y la función endotelial eran dependientes de concentración (figura 22).

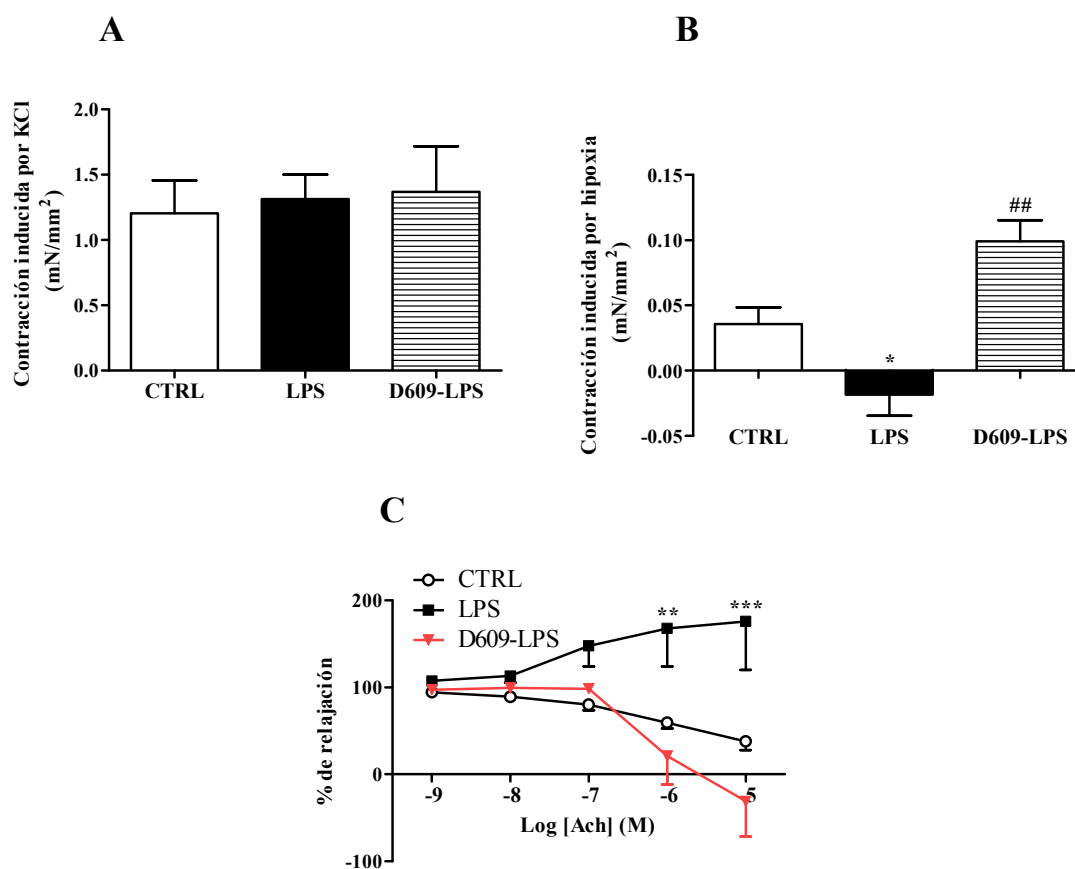


**Figura 22. Efectos del D609 sobre la respuesta contráctil y la disfunción endotelial.** Contracción a KCl (80 mM; A) e hipoxia (B) y relajación a ACh (C) de las AP incubadas 24 horas en ausencia (control) o presencia de LPS (1µg/ml) con D609 5x10<sup>-5</sup> M o D609 10<sup>-4</sup> M. Los resultados están expresados como los valores medios ± e.e.m. (n=6-52 de 4-42 ratas diferentes). \*, \*\* y \*\*\* indican p<0.05, p<0.01 y p<0,001 respectivamente, frente al control (prueba t de student o ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni). ## y ### indican p<0.01 y p<0.001 frente a LPS (prueba t de student).

### 1.3. Efectos del LPS y del D609 sobre la contractilidad y la disfunción endotelial en arterias pulmonares de resistencia humanas

Los efectos del LPS y del inhibidor D609 (10<sup>-4</sup> M) sobre la contractilidad y la función endotelial fueron comparados y analizados también en arterias pulmonares humanas. En estas preparaciones, ni el LPS ni el D609 afectaron la contracción inducida por KCl (figura 23A). Sin embargo, el LPS indujo una disminución de la vasoconstricción hipóxica, mientras que el D609 provocó una hiperrespuesta a hipoxia (figura 23B), tal y

como observamos en AP de resistencia de rata. De forma similar a lo observado en rata, el LPS produjo disfunción endotelial y el tratamiento con D609 previno este efecto (figura 23C).



**Figura 23. Contractilidad y función endotelial en AP humanas.** Respuesta vasoconstrictora a KCl (A), hipoxia (B) y relajación a ACh (C) en AP tratadas 24 horas con LPS (1µg/ml) en ausencia o presencia de D609 (10<sup>-4</sup> M). Los resultados están expresados como los valores medios ± e.e.m. (n=4-23 de 2-15 pacientes diferentes). \*, \*\* y \*\*\* indican  $p<0.05$ ,  $p<0.01$  y  $p<0.001$  respectivamente, frente al control (ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías seguidos de un test post hoc de Bonferroni). # indica  $p<0.05$  frente a LPS (ANOVA de dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni).

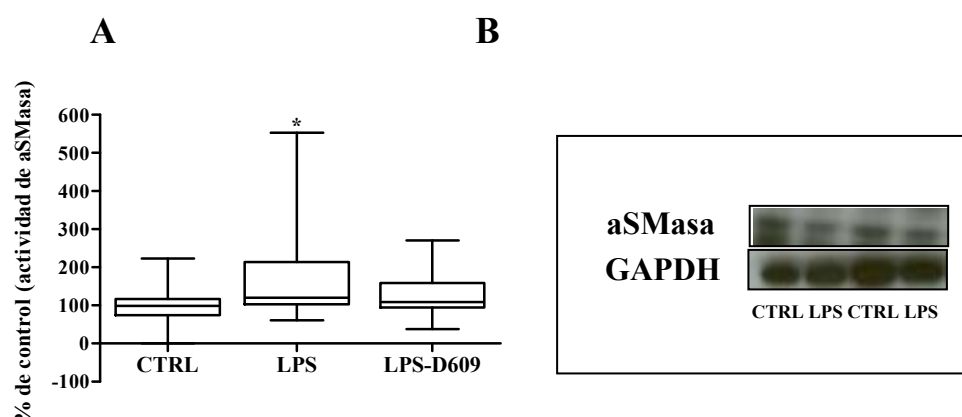


#### 1.4. Modelo animal de DPA inducido por instilación intratraqueal de LPS en rata

Teniendo en cuenta el papel de la aSMasa en la vía de señalización del LPS, nos planteamos analizar la posible utilidad terapéutica de la inhibición de esta enzima en un modelo de DPA inducido por instilación intratraqueal de LPS en rata.

##### 1.4.1. Respuesta inflamatoria pulmonar y marcadores de permeabilidad vascular

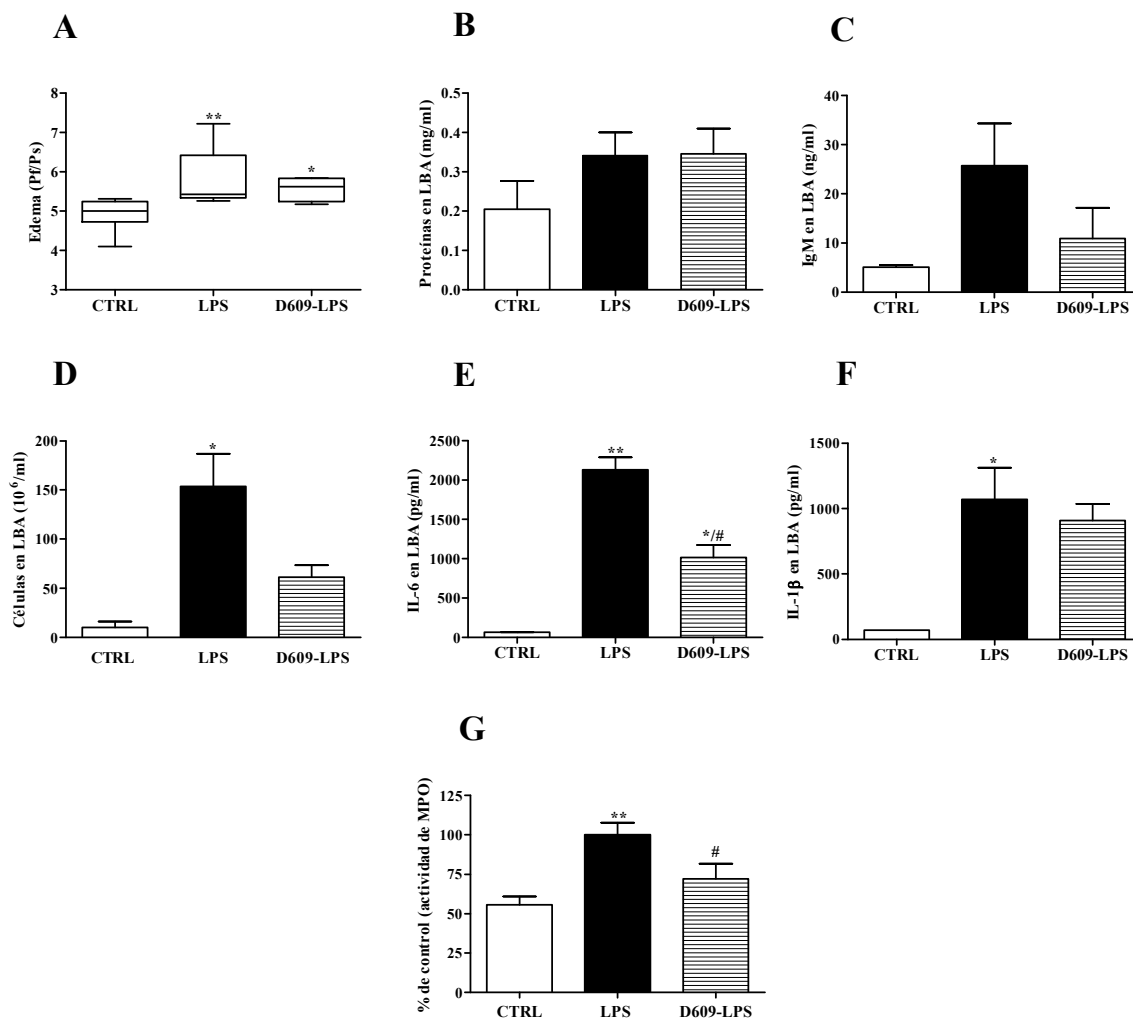
En el modelo animal de DPA en rata se observó que la instilación intratraqueal de LPS (300 µg/Kg peso) aumentó un 30 % la actividad de la aSMasa a nivel pulmonar (figura 24A), a pesar de no encontrarse cambios en los niveles de expresión de la proteína aSMasa (figura 24B), demostrando que el LPS activa la aSMasa también *in vivo*. Además, el tratamiento con D609 (50 mg/Kg peso) previno este aumento en la actividad de la aSMasa pulmonar (figura 24A).



**Figura 24. Determinación de la actividad y de la expresión proteica de la aSMasa *in vivo*.** (A) Actividad de la aSMasa y (B) imagen representativa de un western blot que muestra la expresión de la proteína aSMasa (forma de 70 kDa) en homogenizado de pulmón. Los resultados se expresan mediante el diagrama de cajas y bigotes donde se representan el rango intercuartílico, las medianas y los valores máximos y mínimos de la actividad de la aSMasa en cada grupo ( $n=3-6$ ). \* indica  $p<0.05$  frente al control (test de Kruskal-Wallis no paramétrico seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

Una vez confirmado el aumento de la actividad de la aSMasa también *in vivo*, se evaluó la formación de edema y diferentes marcadores de permeabilidad vascular pulmonar.

El edema pulmonar no cardiogénico es causado por un aumento en la permeabilidad vascular del pulmón, lo que provoca una extravasación de moléculas (por ejemplo la IgM) desde el plasma y un aumento de líquidos y proteínas en el intersticio pulmonar y en las vías respiratorias. La figura 25A muestra que la instilación intratraqueal de LPS provoca el desarrollo de edema pulmonar, como indica el aumento en la relación peso pulmonar fresco/peso pulmonar seco (Pf/Ps) y que el D609 no es capaz de prevenirlo. Los niveles de proteínas totales y de IgM en LBA, utilizados como marcadores de permeabilidad vascular pulmonar, tendían a aumentar tras la instilación con LPS, pero no se encontraron cambios significativos. Además, se evaluaron marcadores de inflamación en tejido pulmonar, LBA y plasma. La instilación intratraqueal con LPS provocó un aumento de células inflamatorias y la liberación de interleuquinas inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6) en el LBA y un aumento de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), una enzima presente en los fagosomas de células inflamatorias ampliamente empleada como marcador de infiltrados pulmonares, en homogenizado de pulmón. El tratamiento con D609 previno el aumento de células inmunes (figura 25D) y de IL-6 inducidos por LPS en LBA (figura 25E), confirmando nuestros datos *in vitro*, pero no fue capaz de prevenir los efectos del LPS sobre la IL-1 $\beta$  (figura 25F). Asimismo, se analizaron los niveles plasmáticos de IL-6 (CTRL= 259.7 $\pm$ 13.1; LPS=315.4 $\pm$ 19.6; D609-LPS=275.7 $\pm$ 3.6) e IL-1 $\beta$  (CTRL=21.5 $\pm$ 5.9; LPS=140.3 $\pm$ 71.2; D609-LPS=36.1 $\pm$ 7.1), pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Por último, se demostró que la inhibición de la aSMasa redujo el aumento de la actividad de la MPO inducida por instilación intratraqueal de LPS en este modelo de DPA *in vivo* (figura 25G).

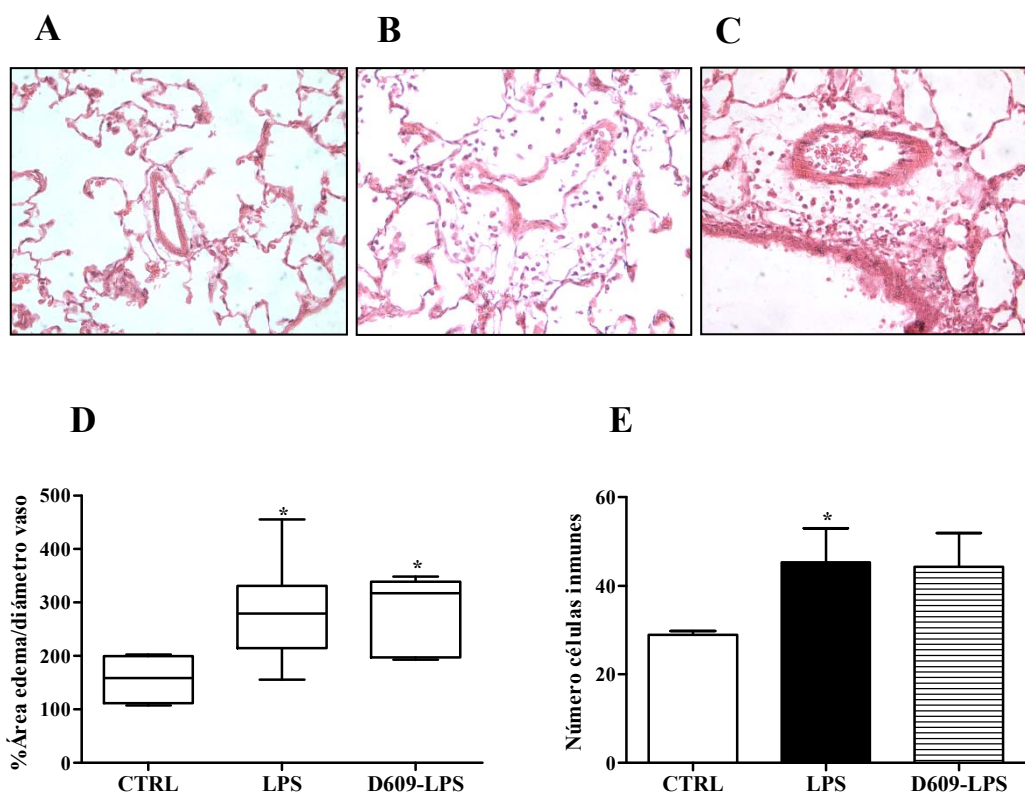


**Figura 25. Evaluación de marcadores de permeabilidad vascular pulmonar e inflamación.** Efectos de D609 sobre el edema pulmonar (A), la concentración de proteínas (B) y de IgM (C), el número de células inmunes (D) y la liberación de IL-6 (E) y IL-1 $\beta$  (F) en LBA y sobre la actividad de la MPO (G) en homogenizado de pulmón inducidos por instilación intratraqueal de LPS. Los resultados son expresados mediante el diagrama de cajas y bigotes donde se representan el rango intercuartílico, las medianas y los valores máximos y mínimos del edema pulmonar en cada grupo o mediante columnas que representan los valores medios  $\pm$  e.e.m. ( $n=2-9$ ). \* y \*\* indican  $p<0.05$  y  $p<0.01$  respectivamente, frente al control (test de Kruskal-Wallis no paramétrico seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn o ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni) y # indica  $p<0.05$  frente a LPS (ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni o prueba t de student).

#### 1.4.2. Análisis histológico

Las lesiones vasculares comienzan por una infiltración de linfocitos y estimulación de la síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos. Las lesiones vasculares, en fases iniciales, consisten en edema de la íntima y depósito de sustancia mucoide compuesta de mucoproteínas y mucopolisacáridos. En fases más avanzadas se aprecia, además, proliferación concéntrica de las células de la íntima, obliteración y trombosis intravascular. La capa media está habitualmente engrosada. En la adventicia, frecuentemente, se aprecia fibrosis que puede extenderse al tejido periadventicial.

El análisis histológico de los cortes de pulmón del modelo de DPA *in vivo* confirmó la presencia de edema pulmonar perivascular en animales sometidos a instilación intratraqueal de LPS respecto al grupo control, pero no fue inhibido por el tratamiento con D609 (figuras 26A-C). En los mismos cortes se determinó el tamaño de los edemas, analizando el porcentaje del área de edema en función del diámetro de los vasos por cada grupo. La figura 26D demuestra que la administración de LPS inducía un aumento del área del edema en el grupo LPS respecto al control, que tampoco fue revertido por el D609. A través del programa Image J, se determinó también el infiltrado inflamatorio en los cortes de pulmón. La instilación intratraqueal de LPS incrementó el número de células inmunes, en correlación con el conteo de células en LBA, aunque el tratamiento con D609 no inhibió este efecto (figura 26E).

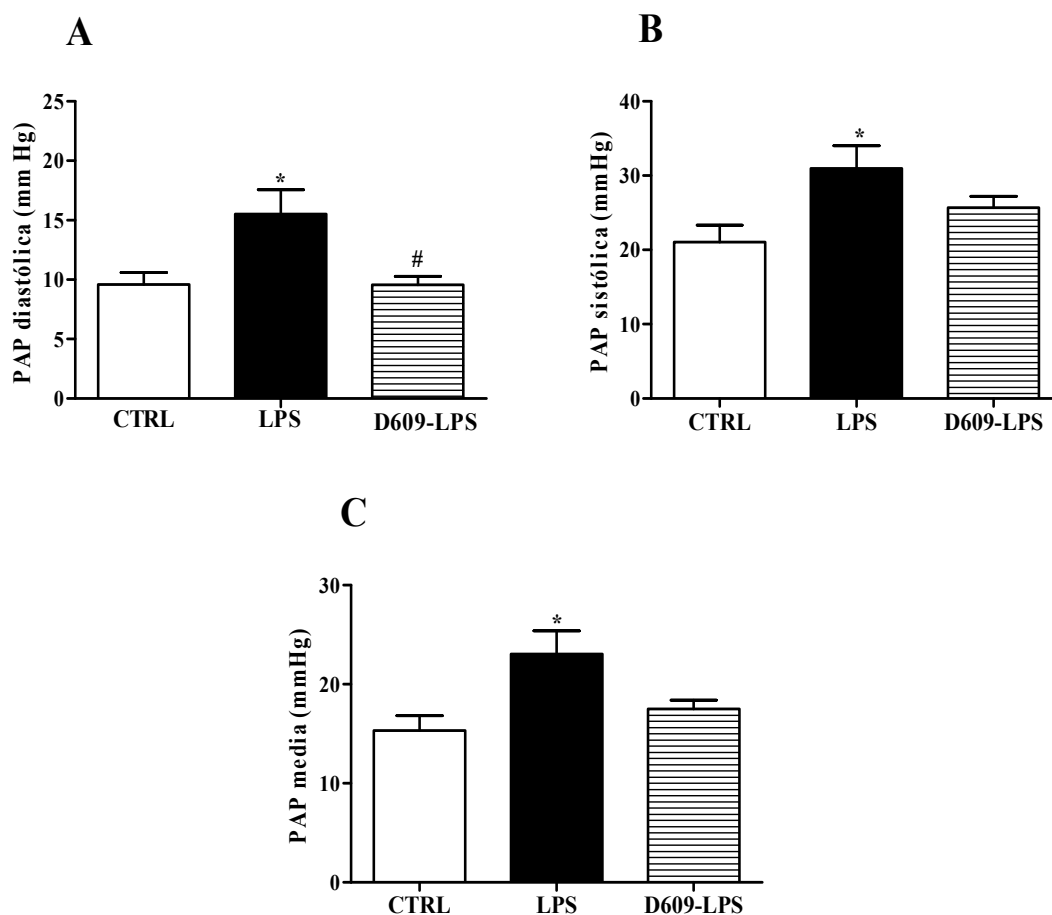


**Figura 26. Análisis histológico.** Imagen representativa (40x) de los cortes de pulmón teñidos con hematoxilina/eosina de control (A), LPS (B) y D609-LPS (C) ( $n=3-6$  ratas de cada grupo, 1 corte por animal y 20-22 campos por cada corte seleccionados aleatoriamente). (D) Diagramas de cajas y bigotes donde se representan el rango intercuartílico, las medianas y los valores máximos y mínimos del porcentaje de edema en función del diámetro del vaso en cada grupo y (E) columnas que representan el número de células inmunes. Cada columna representa los valores medios  $\pm$  e.e.m. \* indica  $p < 0.05$  frente al control (test de Kruskal-Wallis no paramétrico seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn o prueba t de student).

### 1.5. Determinación de la presión arterial pulmonar

Transcurrido un periodo de 4 horas tras la instilación intratraqueal de LPS, los animales fueron anestesiados nuevamente para proceder al registro de la presión arterial pulmonar (PAP) a tórax abierto. Acoplando el animal a un ventilador mecánico y empleando un transductor de presión, se introdujo un catéter a través del ventrículo derecho, hasta la salida de la arteria pulmonar principal. Se tomaron medidas de presión

pulmonar diastólica, presión pulmonar sistólica y se calculó la media entre las dos (PAP media). Los resultados de este modelo de DPA *in vivo* demostraron que la administración de LPS indujo un aumento en la presión arterial pulmonar y que el D609 previno dicho aumento (figuras 27A-C)

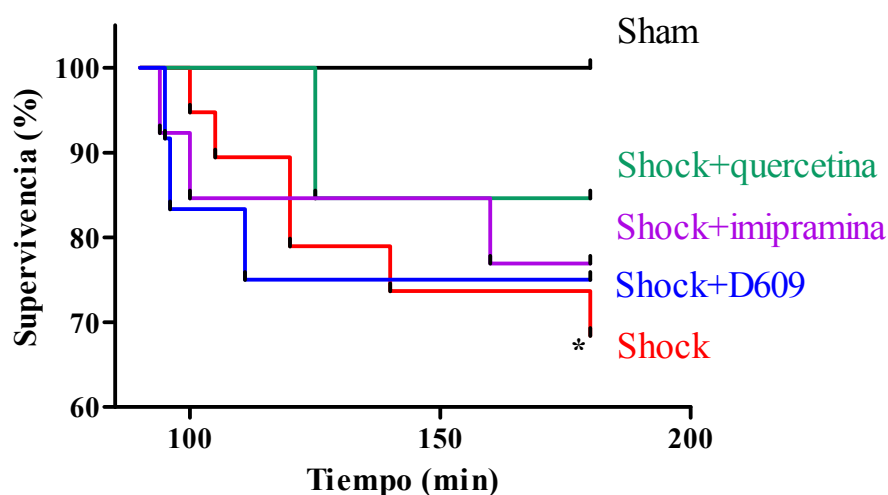


**Figura 27. Valores de la presión arterial pulmonar.** Presión pulmonar diastólica (A), sistólica (B) y media (C) registrada *in vivo*. Los resultados están expresados como los valores medios  $\pm$  e.e.m. ( $n=4-5$ ). \*/# indican  $p<0.05$  frente al control/LPS (ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni).

## **2. EFECTOS DE LA ESFINGOMIELINASA ÁCIDA Y QUERCETINA EN EL MODELO DE SHOCK HEMORRÁGICO Y TRAUMÁTICO**

### **2.1. Mortalidad**

En el grupo shock, la supervivencia a los 90 minutos de la resucitación (minuto 180 del procedimiento) fue del 68.4% (13/19), significativamente inferior a la del grupo sham que fue del 100% (figura 28). En los tres grupos de tratamiento (shock+D609, shock+imipramina y shock+quercetina) la supervivencia fue del 75.0% (9/12), 76.9% (10/13) y 84.6% (2/13) respectivamente. A pesar de que se observó una menor mortalidad, especialmente en el grupo tratado con quercetina, el análisis de supervivencia Kaplan Meier (figura 28) indicó que las diferencias no eran significativas entre estos tres grupos con respecto al grupo shock.

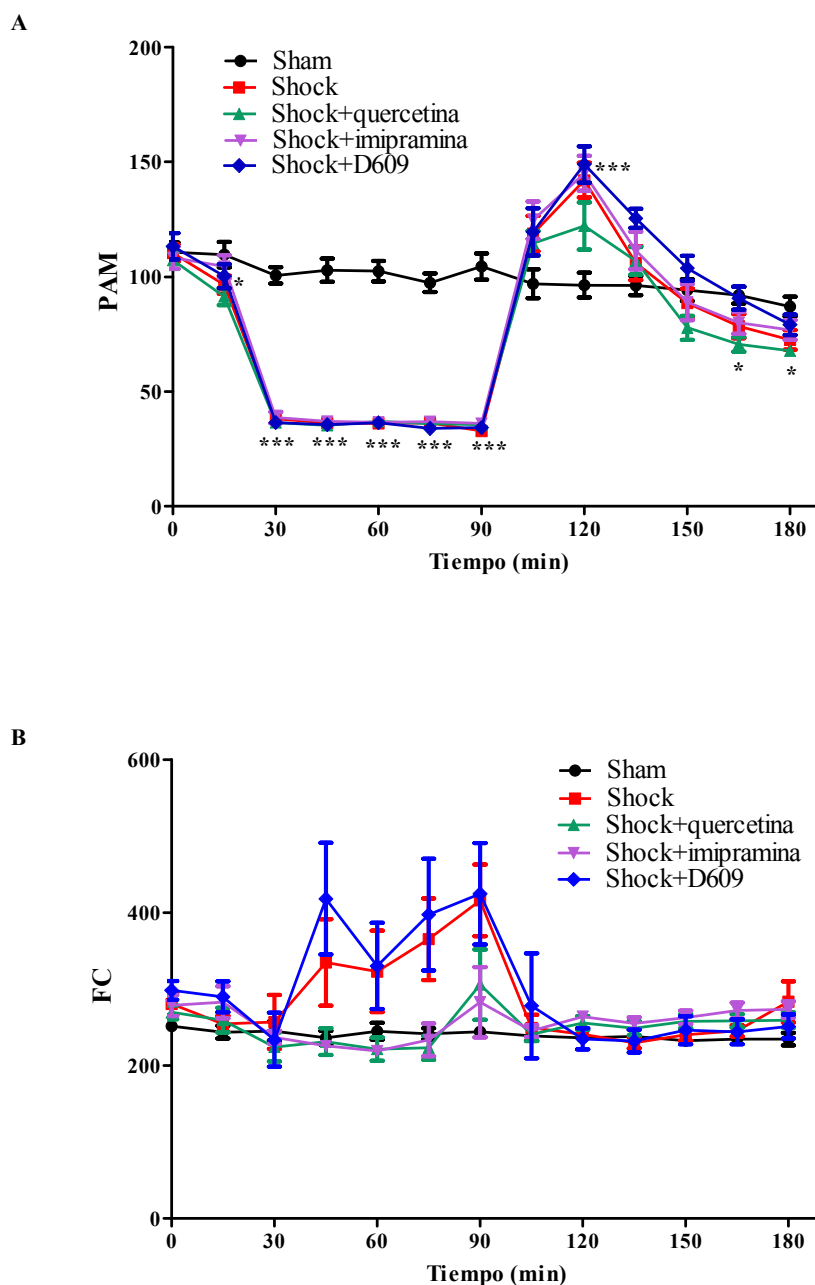


**Figura 28. Análisis de supervivencia Kaplan-Meier durante el período de reperfusión.** Los animales anestesiados se sometieron a shock, a los 90 minutos fueron perfundidos con sangre más Ringer lactato y vehículo, D609 (20 mg/kg), imipramina (1 mg/kg) o quercetina (50 mg/kg), y posteriormente se dejaron un periodo adicional de 90 minutos. Los datos se expresan como porcentaje respecto al grupo control (n=11-20 por cada grupo). \* indica  $P < 0.05$  frente a sham (log-rank test).

## **2.2. Presión arterial y frecuencia cardíaca**

Además del análisis de mortalidad, se realizó una monitorización hemodinámica durante todo el protocolo experimental. La Figura 29A muestra los cambios en la presión arterial media (PAM) en todos los grupos. Las ratas del grupo shock fueron sometidas a un protocolo de trauma y shock hemorrágico seguido de reperfusión. La laparotomía (trauma) indujo una reducción significativa de la presión arterial en los primeros 15 minutos. Durante los 15-30 minutos de la fase de shock, se consiguió una hipotensión significativa mediante la extracción de sangre hasta el objetivo de presión de 35 mmHg que fue mantenido durante todo el periodo de shock (30-90 minutos). La reperfusión produjo una hipertensión transitoria inicial durante el período de la reinfusión (90-120 minutos) de la sangre más Ringer lactato seguida de una fase de hipotensión. La fase de hipertensión fue menos marcada en los animales tratados con quercetina. En cambio, la hipotensión se previno parcialmente en los grupos de D609 e imipramina con valores de presión que no fueron significativamente distintos de los del grupo sham. La Figura 29B muestra los cambios en la frecuencia cardíaca (FC) en los cinco grupos. Durante los minutos 35-90 (fase de shock), la hipotensión se acompañó de un aumento de la frecuencia cardíaca que fue muy variable, de manera que se observó un aumento significativo de la frecuencia cardíaca en algunos animales del grupo shock. En la fase de reperfusión, desde el minuto 90 hasta el 180, la frecuencia cardíaca fue similar en todos los grupos.





**Figura 29. Valores de presión arterial media (A) y de frecuencia cardíaca (B) en los 5 grupos experimentales.** Las ratas fueron sometidas a laparotomía seguida de hipotensión controlada (fase de shock) y posteriormente de reinfusión de la sangre extraída con Ringer Lactato y los fármacos o el vehículo. Los datos se muestran como la media  $\pm$  e.e.m. \* y \*\*\* indican  $P < 0.05$  y  $P < 0.001$ , respectivamente, del grupo shock frente a sham durante la fase de shock y de reperusión (prueba t de student o test de Mann Whitney para los datos no distribuidos normalmente).

### 2.3. Electrolitos, hematocrito y hemoglobina

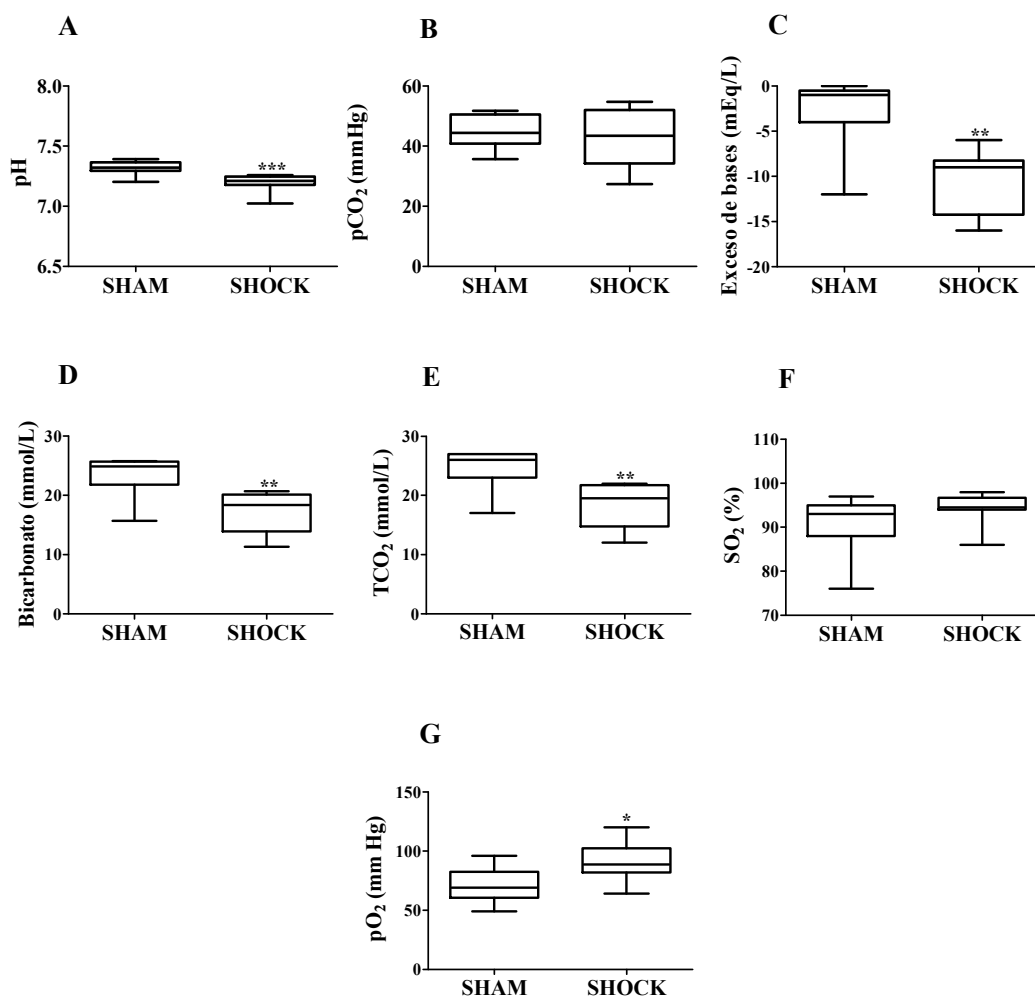
A través del catéter de la arteria carótida, se extrajeron muestras de sangre para poder determinar los cambios en la concentración de electrolitos, hematocrito y hemoglobina. Al final de la fase de shock, se observó un aumento de potasio ( $K^+$ ) y una disminución moderada de sodio ( $Na^+$ ) en plasma en el grupo de shock respecto al grupo control, mientras que la concentración de calcio ( $Ca^{2+}$ ) no se modificó (tabla 7). Durante la fase de shock se produjo anemia, como consecuencia de la hemorragia, con descenso de la hemoglobina (Hb) y el hematocrito, que se revirtió después del período de reinfusión. Los electrolitos, el hematocrito y los valores de hemoglobina al final de la reperfusión fueron similares en todos los grupos, excepto el grupo shock+D609 que presentó una concentración de sodio ligeramente más baja respecto al grupo control (tabla 7).

	Fase de shock (t = 90 min)					Reperfusión (t = 180 min)				
	$Na^+$	$K^+$	$Ca^{2+}$	Hb	Hematocrito	$Na^+$	$K^+$	$Ca^{2+}$	Hb	Hematocrito
<b>Sham</b>	137.4 ±0.82	5.30 ±0.13	1.28 ±0.05	13.38 ±0.37	39.40 ±1.07	137.0 ±2.84	5.10 ±0.16	1.19 ±0.11	12.62 ±0.33	37.11 ±0.95
<b>Shock</b>	132.0*** ±0.85	6.33** ±0.26	1.18 ±0.12	9.50*** ±0.50	27.88*** ±1.47	131.79 ±2.37	5.84 ±0.17	0.95 ±0.09	11.59 ±0.37	34.07 ±1.09
<b>Shock +D609</b>	nd	nd	nd	nd	nd	127.50* ±2.57	5.80 ±0.30	0.71 ±0.11	12.35 ±0.29	36.36 ±0.85
<b>Shock +imipramina</b>	nd	nd	nd	nd	nd	128.90 ±2.27	5.49 ±0.19	0.75 ±0.11	13.09 ±0.58	38.50 ±1.70
<b>Shock +quercetina</b>	nd	nd	nd	nd	nd	133.36 ±1.52	5.40 ±0.17	1.18 ±0.12	12.93 ±0.42	38.00 ±1.22

**Tabla 7. Valores de electrolitos, hematocrito y hemoglobina durante la fase de shock y al final de la reperfusión.** Los resultados están expresados como la media ± e.e.m. \*\* y \*\*\* indican  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$  respectivamente, frente a sham (prueba t de student). \* indica  $P < 0.05$  frente a sham (test de Kruskal-Wallis no paramétrico seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

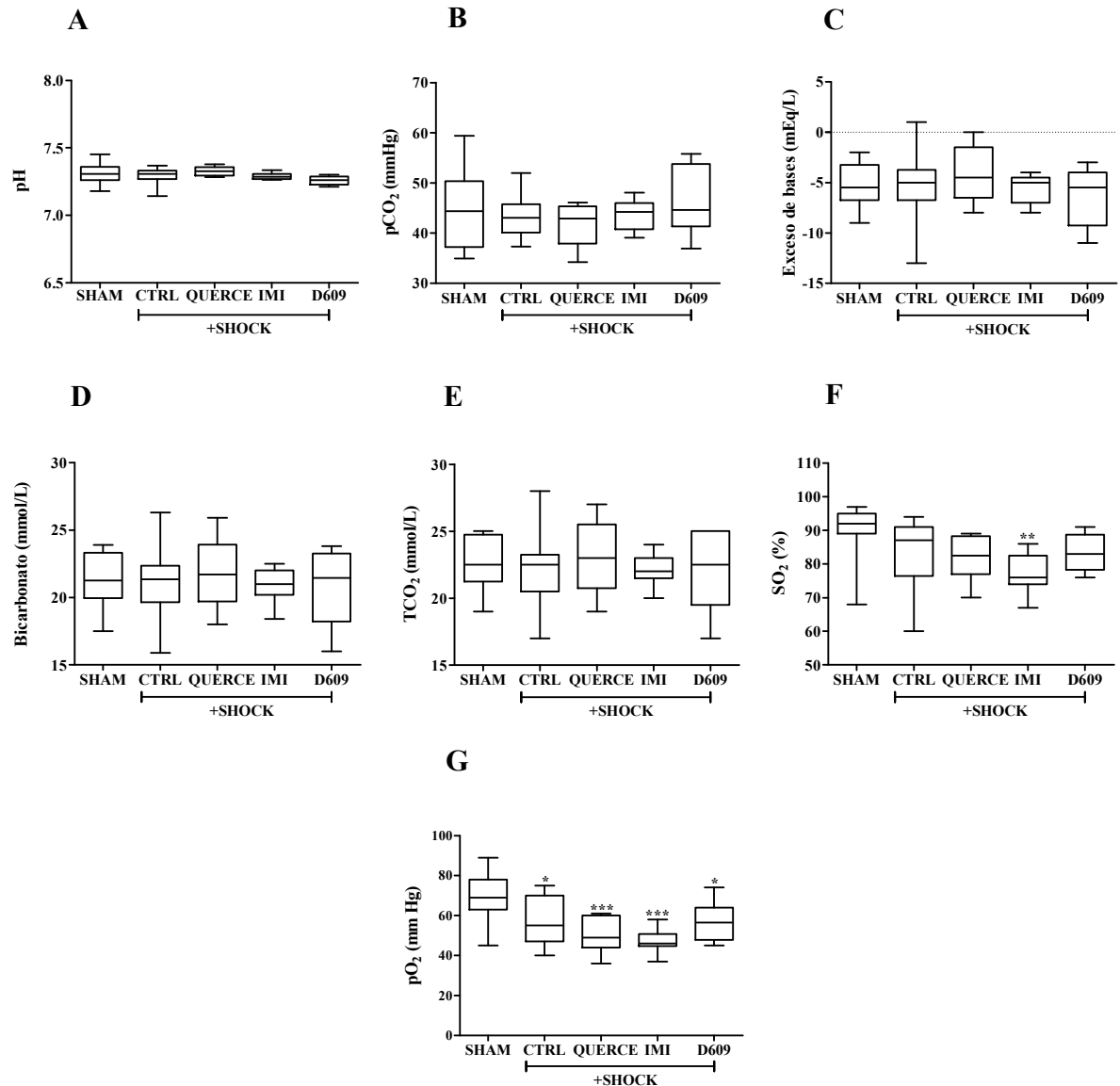
## 2.4. Gasometrías

Además, se analizaron los cambios en la gasometría sanguínea. Después de 90 minutos de shock, los animales desarrollaron acidosis metabólica con una disminución significativa en el pH, exceso de bases, bicarbonato y en la concentración total de CO<sub>2</sub> (TCO<sub>2</sub>), sin cambios en la saturación de O<sub>2</sub> (SO<sub>2</sub>) y en la presión parcial de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) (figuras 30A-G).



**Figura 30. Gasometrías.** Valores de pH (A), pCO<sub>2</sub> (B), exceso de bases (C), bicarbonato (D), TCO<sub>2</sub> (E), SO<sub>2</sub> (F) y pO<sub>2</sub> (G) en los grupos sham y shock a los 90 minutos (al final de la fase de shock). Los resultados están expresados mediante el diagrama de cajas y bigotes donde se representan el rango intercuartílico, las medianas y los valores máximos y mínimos en cada grupo. \*, \*\* y \*\*\* indican  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$  respectivamente frente a sham (prueba *t* de student o test de Mann Whitney para los datos no distribuidos normalmente).

Tal y como muestra la figura 31, al final del período de reperfusión, se restablecieron los valores de pH,  $p\text{CO}_2$ , el exceso de base, bicarbonato y  $\text{TCO}_2$  en el grupo de shock ( $P>0.05$  frente al grupo sham, figuras A-E), pero los animales desarrollaron hipoxemia con una disminución significativa en la  $p\text{O}_2$  y una tendencia similar para la  $\text{SO}_2$  (figuras 31F, G). La hipoxemia inducida por el shock y la reperfusión no se revirtió por ninguno de los fármacos y paradójicamente disminuyó más tras el tratamiento con quercetina e imipramina. La  $\text{SO}_2$  resultó disminuida en el grupo shock, aunque de forma no significativa, y los fármacos no mejoraron este efecto. De hecho, la imipramina redujo todavía más la saturación de  $\text{O}_2$  respecto al grupo sham.



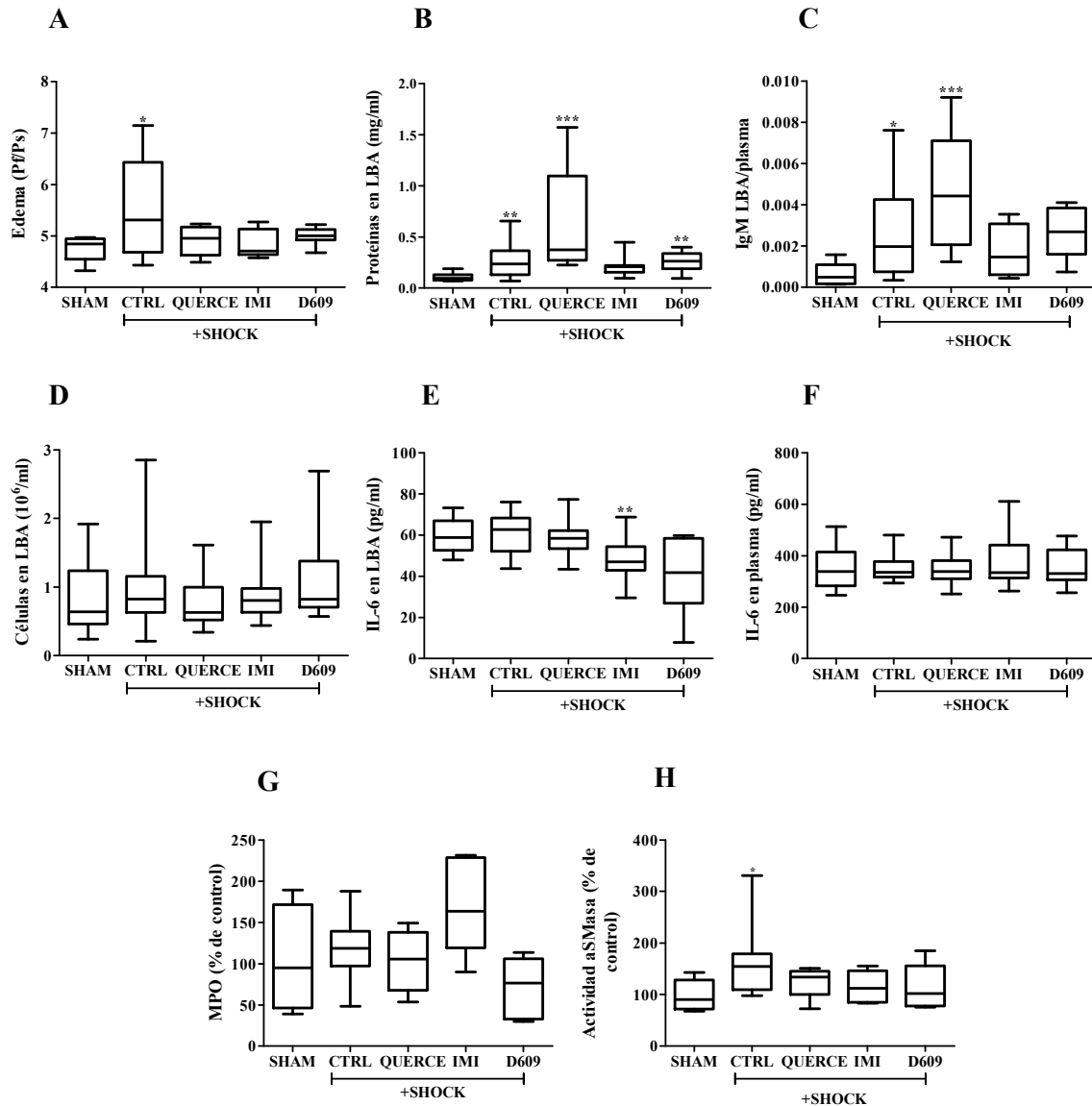
**Figura 31. Gasometrías.** (A) Valores de pH, (B) pCO<sub>2</sub>, (C) exceso de bases, (D) bicarbonato, (E) TCO<sub>2</sub>, (F) SO<sub>2</sub> y (G) pO<sub>2</sub> en el grupo sham, shock (CTRL), shock+quercetina (QUERCE), shock+imipramina (IMI) y shock+D609 a los 180 minutos (al final de la reperfusión). Los resultados están expresados mediante el diagrama de cajas y bigotes donde se representan el rango intercuartílico, las medianas y los valores máximos y mínimos en cada grupo. \*\* indica  $P < 0.01$  frente a sham (test de Kruskal-Wallis no paramétrico seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Dunn). \* y \*\*\* indican  $P < 0.05$  y  $P < 0.001$  respectivamente, frente a sham (ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Dunnett).

## 2.5. Marcadores de inflamación y permeabilidad vascular pulmonar

Tras la monitorización hemodinámica y la gasometría, se evaluaron marcadores de inflamación y permeabilidad vascular pulmonar al final de la reperfusión. La figura 32A muestra que los animales sometidos a shock más reperfusión desarrollaron edema pulmonar, como se indica por un aumento en la relación peso pulmonar fresco/peso pulmonar seco (Pf/Ps). Los tres tratamientos con fármacos inhibieron el desarrollo de edema. Las proteínas en LBA, utilizadas como marcadores de permeabilidad vascular pulmonar, aumentaron en el grupo shock en comparación con el grupo sham (figura 32B). De manera similar se observó un aumento de la IgM, sugiriendo que el origen de las proteínas aumentadas en el LBA es el plasma. Paradójicamente, la quercetina aumentó los niveles de proteínas totales y de IgM en LBA (figura 32C). En los animales tratados con imipramina, los niveles de proteínas e IgM no fueron distintos a los del grupo sham, sugiriendo que previene los cambios en la permeabilidad vascular. Sin embargo, el tratamiento con D609 no fue capaz de prevenir el aumento en los niveles de proteínas totales en el LBA, a pesar de prevenir el incremento en los niveles de IgM (figuras 32B, C).

Se evaluaron también marcadores de inflamación en LBA, pulmón y plasma. Tanto el número de células inflamatorias en el LBA como la actividad de la MPO en pulmón, fueron similares entre los grupos sham y shock (figuras 32D, G). Asimismo, la concentración de IL-6 tanto en plasma como en LBA fue similar en los grupos sham y shock (figuras 32E, F). Ninguno de los tratamientos administrados modificaron estos parámetros inflamatorios, salvo el D609 que disminuyó significativamente la concentración de IL-6 en el LBA (figura 32E).

Como se ha descrito en el apartado anterior, la aSMasa está implicada en la patogénesis del DPA inducido por el LPS. La figura 32H muestra que la actividad de la aSMasa se incrementó en el grupo shock respecto al grupo sham y todos los fármacos previnieron su activación.

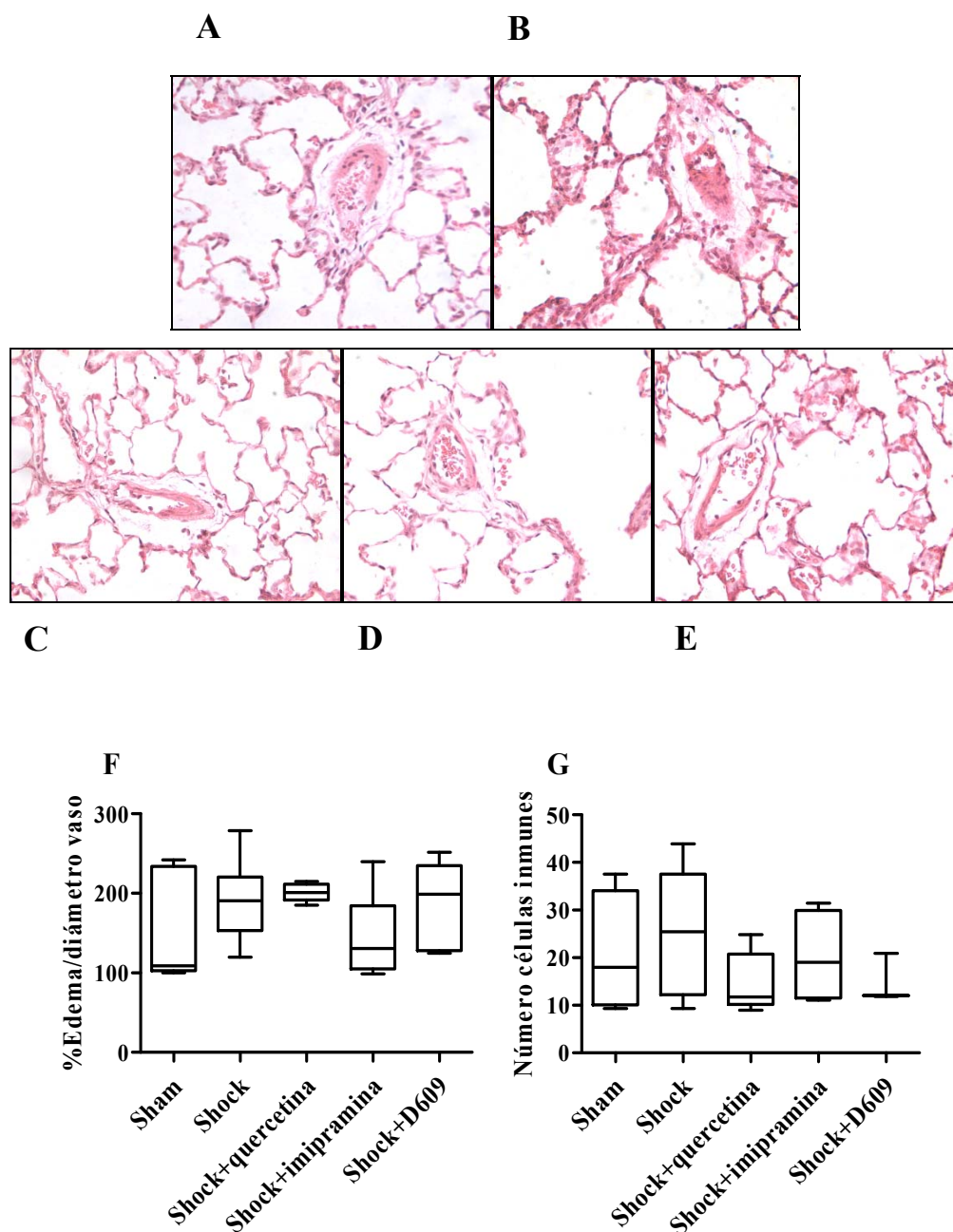


**Figura 32. Marcadores de inflamación y permeabilidad vascular.** Edema (Pf/Ps) (A), proteínas (B) en LBA, el ratio IgM LBA/plasma (C), células en LBA (D), IL-6 (E) en LBA y en plasma (F), actividad de mieloperoxidasa (MPO; G) y de aSMasa (H) en el grupo sham, shock (CTRL), shock+quercetina (QUERCE), shock+imipramina (IMI) y shock+D609 al final del periodo de reperfusion. Los resultados están expresados mediante el diagrama de cajas y bigotes donde se representan el rango intercuartílico, las medianas y los valores máximos y mínimos en cada grupo. \*, \*\* y \*\*\* indican  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$  frente a sham (ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Dunnett o test de Kruskal-Wallis no paramétrico seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn).

## **2.6. Análisis histológico**

El análisis histológico de los cortes de pulmón del modelo de shock hemorrágico traumático sugirió la presencia de edema pulmonar perivascular en animales sometidos a shock y reperfusión respecto al grupo control, pero que no llegó a ser significativa (figuras 33A-E). Los fármacos no redujeron la presencia de tal edema. En los mismos cortes se determinó el tamaño de los edemas, analizando el porcentaje del área de edema en función del diámetro de los vasos por cada grupo. La figura 33F muestra que en el grupo shock, el área del edema tiende a aumentar respecto al grupo sham, pero sin ser significativo. El tratamiento con fármacos no revirtió este efecto, aunque la imipramina parece acercarse más a los valores del grupo sham. Por último, a través del programa Image J, se determinó el infiltrado inflamatorio en los cortes de pulmón. La figura 33G muestra que el shock indujo un pequeño aumento en el número de células inmunes, pero no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, lo que se correlaciona con el conteo de células en LBA.





**Figura 33. Análisis histológico.** Imagen representativa (40x) de los cortes de pulmón teñidos con hematoxilina/eosina de sham (A), shock (B), shock+quercetina (C), shock+imipramina (D), shock+D609 (E) ( $n=1$  corte y 20-22 campos seleccionados aleatoriamente de 3-5 ratas de cada grupo). (G, H) Diagramas de cajas y bigotes donde se representan el rango intercuartílico, las medianas y los valores máximos y mínimos del porcentaje de edema en función del diámetro del vaso y del número de células inmunes, respectivamente, en cada grupo.

## 2.7. Translocación bacteriana

La pérdida de función de la barrera intestinal que tiene lugar en el shock hemorrágico traumático es uno de los eventos iniciales implicados en el desarrollo de DPA. Como consecuencia de este fenómeno se detecta la translocación bacteriana que consiste en el paso de bacterias desde la luz del intestino hacia el medio interno, con la aparición de bacteriemias endógenas y de infecciones a distancia, especialmente en el pulmón, y de sepsis abacteriémicas por absorción de endotoxina y otros productos bacterianos.

Por esta razón analizamos, en nuestro modelo de shock hemorrágico traumático, analizamos la presencia del ADN bacteriano en plasma. Para este análisis se empleó como control positivo *E. coli*, se diseñaron cebadores dirigidos contra las regiones conservadas del gen 16 S rADN y se efectuó una PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados demostraron que no había ADN bacteriano en el plasma de ninguno de los animales, lo que indica que no se produjo translocación bacteriana.



## **DISCUSIÓN**



## 1. MODELO DE DPA INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

### 1.1. Papel de la vía SMasa-ceramida en la respuesta inflamatoria vascular inducida por endotoxina *in vitro*

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral muestran que la exposición a LPS estimula la producción de IL-6 en el músculo liso vascular pulmonar, a través de un mecanismo que es sensible a glucocorticoides y en el que intervienen la activación de la aSMasa, TAK-1 y los receptores de serotonina 5HT<sub>2A</sub>, pero que es independiente de iNOS. Además, la exposición a SMasa exógena mimetiza los efectos del LPS puesto que estimula la liberación de IL-6 por las CMLVAP y este efecto muestra una sensibilidad a inhibidores farmacológicos similar al LPS, con excepción del antagonista de TLR4 TAK-242, lo que sugiere que los efectos de la SMasa son independientes de TLR4.

La IL-6 es una molécula secretada por diferentes tipos celulares incluyendo células endoteliales, CMLV o fibroblastos, y que activa mecanismos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios. Además, esta interleuquina tiene un papel crucial en la diferenciación y maduración de las células inmunes y en su correcta función en situaciones de estrés [Cross and Matthay, 2011]. Un gran número de evidencias sugieren que niveles elevados de IL-6 se correlacionan con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares [Collaboration et al., 2012]. Estudios recientes demuestran que la IL-6 está elevada en plasma y LBA, tanto en modelos experimentales como en pacientes en estado crítico con DPA, y que niveles elevados de IL-6 o de su receptor soluble (sIL-6R; agonista endógeno de IL-6) se asocian con un aumento de la mortalidad [Cross and Matthay, 2011; Park et al., 2001]. Además, la IL-6 parece modular la respuesta inflamatoria y el remodelado vascular pulmonar en un modelo experimental de HP inducida por hipoxia en ratón [Savale et al., 2009] y su sobreexpresión estimula la proliferación de las CMLV, reduciendo el lumen de los vasos y produciendo HP [Steiner et al., 2009]. Además, la IL-6 no tiene solo efectos sobre el remodelado vascular, sino que es capaz de modular directamente el tono vascular puesto que es capaz de inhibir la eNOS a través de un mecanismo que implica la inhibición de Akt y la estabilización de las interacciones entre la eNOS y la caveolina-1 [Hung et al., 2010]. Asimismo, se ha observado que la IL-6 puede estimular

la producción de serotonina, uno de los principales vasoconstrictores y estimulantes de la proliferación de las CMLVAP implicados en el desarrollo de la HP, si bien este mecanismo de regulación parece ser bidireccional [Ito et al., 2000; Kubera et al., 2005; Miyata et al., 2001; Zhang et al., 2001]. Por último, estudios recientes han identificado polimorfismos en el gen de la IL-6 asociados con el desarrollo de enfermedades inflamatorias e HP en pacientes con EPOC [Chaouat et al., 2009]. Por el contrario, otras evidencias sugieren que la IL-6 liberada por las células hematopoyéticas podría tener un papel protector al reducir la disrupción de la barrera alveolar en un modelo de DPA inducido por ventilación mecánica [Wolters et al., 2009]. Todas estas evidencias sugieren la posible implicación de la IL-6 en alteraciones de la vasculatura pulmonar y en enfermedades pulmonares, razón por la cual nos hemos centrado en el papel de la IL-6 en el DPA.

Por otro lado, evidencias recientes sugieren un importante papel de los **esfingolípidos** en el desarrollo pulmonar y en los procesos de daño y reparación pulmonar [Tibboel et al., 2014]. La ceramida, generada *de novo* o por acción de las esfingomielinasas, se produce en respuesta a diversos estímulos de estrés celular e inflamación. Esta molécula juega un papel importante como segundo mensajero intracelular en la regulación de procesos celulares clave como la diferenciación, el crecimiento, la apoptosis o la inmunidad innata y adquirida. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que la ceramida desempeña un papel crucial en el control del tono vascular pulmonar y que, de hecho, la producción de ceramida es un evento temprano y necesario en la cascada de señalización de la VPH, que conduce a la activación de PKC $\zeta$ , la producción de ERO, la inhibición de los canales Kv, la vasoconstricción y el aumento de la presión pulmonar [Cogolludo et al., 2009a; Frazziano et al., 2011; Moral-Sanz et al., 2011]. Evidencias más recientes sugieren que la activación de la nSMasa podría ser un mecanismo conservado en tejidos especializados en detectar cambios de oxígeno como el ductus arteriosus [Moreno et al., 2014]. Los esfingolípidos están también implicados en la respuesta inflamatoria y un elevado número de evidencias experimentales y clínicas indican un papel crítico de la forma secretada de la aSMasa en la patogénesis del DPA y de la sepsis. Así, la aSMasa se considera un mediador clave del edema pulmonar en modelos experimentales de DPA [Goggel et al., 2004], es secretada por las células endoteliales ante un estímulo bacteriano y sus niveles plasmáticos aumentan en pacientes en estado crítico [Claus et al., 2005]. De hecho, un aumento en la actividad

aSMasa en plasma o en monocitos se ha descrito tanto en modelos experimentales como en pacientes con sepsis, en los que se ha correlacionado con un aumento de la mortalidad [Claus et al., 2005; Delogu et al., 1999; Drobnik et al., 2003]. La inhibición de la aSMasa por D609 o imipramina limita la formación de edema pulmonar causado por el factor activador de plaquetas (PAF) o LPS [Goggel et al., 2004]. Estos descubrimientos sugieren que la inhibición de la aSMasa podría ser una diana terapéutica útil en el tratamiento de DPA y sepsis.

La desipramina y el D609 son dos compuestos no relacionados químicamente que tienen en común su capacidad de inhibir la esfingomielinasa ácida. La desipramina es un metabolito activo de la imipramina, la cual es un antidepresivo tricíclico que se utiliza principalmente en el tratamiento de la depresión mayor. También se ha utilizado en el trastorno de pánico y enuresis. El D609 es conocido por sus propiedades antivirales, antitumorales y sus efectos son ampliamente atribuidos a la inhibición de la enzima esfingomielinasa ácida. Tanto la desipramina como el D609 son utilizados como inhibidores de la aSMasa y, en algunos estudios se ha observado que reducen la formación de edema inducido por PAF [Yang et al., 2010], razón por la cual se eligieron como fármacos en esta Tesis Doctoral.

Nuestros resultados demuestran que la exposición *in vitro* de CMLVAP a LPS induce un aumento en la liberación de ceramida y que la inhibición de la aSMasa (mediante D609, desipramina o técnicas de silenciamiento génico) previene el aumento de IL-6 inducido por el LPS, sugiriendo que la activación de esta enzima podría modular la inflamación vascular inducida por el LPS *in vitro*. Otros trabajos también han demostrado que el LPS es capaz de aumentar la producción de ceramida en líneas de macrófagos de ratón [MacKichan and DeFranco, 1999] o en macrófagos alveolares humanos [Monick et al., 2001]. De hecho, el grupo de Gary W. Hunninghake propone que la síntesis de ceramida es un evento temprano en la señalización del LPS y que la activación del complejo TLR4 podría provocar la interacción con la enzima esfingomielinasa. En este sentido, algunos autores sugieren que la activación de la aSMasa, la producción de ceramida y la activación de PKC $\zeta$  podrían ser los responsables de la activación de TLR4 por el LPS y el reclutamiento de moléculas adaptadoras [Cuschieri et al., 2007; Cuschieri et al., 2004; Pfeiffer et al., 2001]. De hecho, la administración de SMasa o de ceramida exógenas parece ser capaz de activar respuestas inflamatorias dependientes de TLR4 en ciertos tipos celulares [Fischer et al., 2007]. Sin embargo, nuestros datos muestran que en las CMLVAP la SMasa exógena



estimula la producción de IL-6 a través de un mecanismo que es independiente de TLR4.

Entre los fármacos antiinflamatorios, los **glucocorticoides** han sido uno de los tratamientos más investigados en el SDRA. Los glucocorticoides atenúan la inflamación, y aumentan el flujo tisular en modelos experimentales de shock séptico, lo que contribuye al aumento en la supervivencia de poblaciones seleccionadas [Chatterjee et al., 2007]. Tratamientos prolongados con dosis moderadas de glucocorticoides reducen la unión de NF- $\kappa$ B al ADN y la transcripción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . En modelos animales de DPA, el tratamiento con dosis moderadas de glucocorticoides mejora el intercambio de gases, la dependencia del ventilador mecánico, la difusión de la inflamación a órganos extrapulmonares y reduce la disfunción cardiovascular [Annane, 2007]. Sin embargo, el efecto del tratamiento prolongado con glucocorticoides sobre la supervivencia en el SDRA sigue siendo controvertido. Así, mientras que un estudio monocéntrico aleatorizado [Annane, 2007] mostró un aumento en la tasa de supervivencia en los pacientes tratados con glucocorticoides a los 7 días del establecimiento del SDRA, otro ensayo clínico multicéntrico [Annane, 2007] no encontró ningún beneficio sobre la supervivencia y, de hecho, sugería que si los glucocorticoides se administraban cuando la enfermedad ya estaba avanzada, podían potenciar el daño. Así, dosis altas de corticosteroides producen efectos secundarios como hipertensión, hiperglucemia, tromboembolismo, disfunción gastrointestinal y un incremento del riesgo de infecciones mortales [Chatterjee et al., 2007].

La caracterización de la vía de señalización activada por el LPS y la SMasa exógena ha revelado además un papel clave de la quinasas **TAK1** en la producción de IL-6 en CMLVAP. TAK-1 es un miembro de la familia de las proteínas quinasas quinasas activadas por mitógenos (MAPKKK) que es activado por ligandos de receptores TLR y mediadores inflamatorios tales como la IL-1 $\beta$  o TNF $\alpha$  [Broglie et al., 2010]. Dentro de las vías de señalización intracelular activadas por los receptores de inmunidad innata, TAK-1 parece ser un elemento esencial que modula la activación de las MAPKs y el factor NF- $\kappa$ B y regula, por tanto, la expresión de mediadores inflamatorios, incluyendo la IL-6 [Broglie et al., 2010]. Además, nuestros datos apoyan la idea de que la activación de TAK-1 actúa como un mediador de los efectos de la ceramida [Shirakabe et al., 1997] puesto que la liberación de IL-6 por las CMLVAP tras

el tratamiento con SMasa exógena se redujo significativamente al inhibir TAK-1 con 5z-7-oxozeaenol.

Por último, los efectos observados con el inhibidor de la iNOS, 1400W, y el antagonista de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, sarpogrelato, sugieren que la producción de IL-6 en las CMLVAP de rata sería independiente de la inducción de iNOS pero dependería, al menos parcialmente, de la **serotonina (5-HT)** ), confirmando hallazgos anteriores de otros grupos.

## 1.2. Relación entre la vía de iNOS y aSMasa

Puesto que los resultados obtenidos *in vitro* sugerían que la aSMasa modulaba la producción de IL-6 mediante un mecanismo independiente de la vía de iNOS, decidimos analizar la posible interacción entre estas dos vías. Nuestros datos *in vitro* sugieren que, a diferencia del LPS, la SMasa exógena no es capaz de modificar significativamente los niveles de nitrito en las CMLVAP de rata. Estos datos parecen entrar en conflicto con estudios previos que sugieren que la vía de la SMasa estimula la expresión de iNOS mediada por LPS y citoquinas en astrocitos o células gliales de rata [Pahan et al., 1998]. Sin embargo, es importante destacar que la exposición a SMasa o ceramida en estas células tampoco tiene ningún efecto directo sobre la producción de NO sino que potencia la producción de NO y la expresión de iNOS estimulados por LPS o citoquinas, posiblemente como consecuencia de una interacción a nivel de NF- $\kappa$ B. Desconocemos si este fenómeno sinérgico ocurre también en las CMLVAP.

El análisis de la contribución de la vía aSMasa-TAK-1 en los efectos inducidos por el LPS sobre la iNOS dio resultados contradictorios. Así, mientras que ni el 5z-7-oxozeaenol ni la desipramina fueron capaces de modificar la producción de nitritos, el D609 redujo los niveles de nitritos en un 40%. mostrando, por lo tanto, una falta de correlación con los datos previos que sugerían que estas dos vías eran independientes. De nuevo, las evidencias disponibles no nos permiten excluir la posibilidad de que exista una interacción entre la vía de la iNOS y de la aSMasa o que estos resultados simplemente reflejen posibles efectos inespecíficos del D609.

### **1.3. Papel de la aSMasa y la IL-6 en el desarrollo de disfunción vascular pulmonar inducida por endotoxina *in vitro***

Aunque sabemos desde hace décadas que el desarrollo de disfunción vascular pulmonar e HP es relativamente frecuente en pacientes con SDRA [Price et al., 2012; Ryan et al., 2014; Zapol and Snider, 1977], ha sido recientemente cuando se ha demostrado que el aumento de las resistencias vasculares pulmonares (RVP) es un factor que se asocia de forma independiente con una mayor mortalidad [Bull et al., 2010]. Aunque la introducción de las estrategias de ventilación protectoras probablemente habrá limitado también la gravedad de la HP en los pacientes con SDRA, es importante destacar que el aumento de la mortalidad con el aumento de las RVP encontrado en este estudio ocurre en el contexto de estrategias de ventilación protectora definidas por protocolo por lo que son imprescindibles más estudios para caracterizar el papel y la naturaleza de la disfunción vascular pulmonar en el SDRA de la era de la ventilación protectora [Bull et al., 2010; Price et al., 2012; Ryan et al., 2014].

Los resultados presentados en el apartado 1.2 de esta Tesis Doctoral demuestran que la exposición *in vitro* a LPS induce en las AP disfunción endotelial y genera un patrón de cambios en la reactividad vascular que es específico del vasoconstrictor analizado. Así, mientras que el LPS es capaz de inhibir la vasoconstricción pulmonar inducida por fenilefrina o por hipoxia en AP de rata y humano, aumenta la vasoconstricción inducida por serotonina y produce una marcada disfunción endotelial. Estos resultados contrastan con los obtenidos en arterias sistémicas, en las cuales el LPS induce la expresión de iNOS e inhibe la contractilidad vascular de forma generalizada, lo que explicaría en último término la hipotensión y el shock inducido por la sepsis [Cartwright et al., 2007a; Cartwright et al., 2007b]. Sin embargo, nuestros datos confirman los hallazgos obtenidos en otros modelos de DPA, tanto inducido por endotoxina como por ventilación mecánica, en los que el patrón de alteraciones en la circulación pulmonar es específico del vasoconstrictor analizado [Griffiths et al., 1997; Menendez et al., 2013; Villamor et al., 1995].

El empleo de inhibidores farmacológicos nos ha permitido caracterizar los mecanismos implicados en las alteraciones en la reactividad vascular inducida por el LPS. De forma resumida, las evidencias presentadas en esta Tesis Doctoral sugieren que el fracaso de la

VPH y la disfunción endotelial inducida por el LPS, tanto en AP de rata como de humano, implican la activación de la aSMasa, son sensibles a glucocorticoides e inhibidores de la iNOS pero son independientes de TAK-1. Por otro lado, la hiperrespuesta vascular a serotonina inducida por LPS es dependiente de la aSMasa y de TAK-1, es parcialmente sensible a glucocorticoides pero es independiente de iNOS. Por último, la hiporrespuesta a fenilefrina se previene mediante la inhibición de iNOS y es independiente de la aSMasa. De forma similar, la SMasa exógena y la IL-6 reproducen los efectos del LPS sobre la VPH, la respuesta contráctil inducida por la serotonina y la disfunción endotelial pero no inducen hiporrespuesta a fenilefrina. Cabe destacar que el hecho de que la IL-6 potencie los efectos vasoconstrictores de la serotonina sugiere que, en las AP, la relación entre estos dos mediadores es bidireccional, confirmando de nuevo hallazgos previos de otros grupos [Miyata et al., 2001; Zhang et al., 2001]. En base a los resultados obtenidos proponemos que el LPS induce disfunción vascular pulmonar a través del mecanismo de señalización representado en el diagrama 1.

Los efectos observados con el glucocorticoide dexametasona y el inhibidor de la iNOS 1400W sugieren que la inducción de genes sensibles a los corticosteroides, entre ellos la iNOS, serían los principales responsables de la hiporrespuesta a fenilefrina y modularían, al menos parcialmente, la inhibición de la VPH y la disfunción endotelial. Un gran número de estudios han demostrado que la inducción de la iNOS inhibe la vasoconstricción mediada por agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos e inhibe la función endotelial, probablemente como consecuencia de la formación de peroxinitrito, tanto en AP [Menendez et al., 2013] como en arterias sistémicas [Cartwright et al., 2007a; Cartwright et al., 2007b]. En este sentido, cabe destacar que tanto la dexametasona como el 1400W potenciaron la vasoconstricción inducida por fenilefrina en AP incubadas en condiciones control. Estos efectos podrían sugerir deficiencias en el protocolo de extracción e incubación de las preparaciones vasculares que fueran responsables de la inducción de iNOS en nuestras condiciones “control” y, por otra parte, podrían reflejar un aumento de la expresión de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos por parte del glucocorticoide [Girod and Brotman, 2004; Sakaue and Hoffman, 1991; Ullian, 1999]. Por otro lado, el hecho de que la inhibición de iNOS no fuera capaz de modificar el exceso de vasoconstricción pulmonar inducida por la serotonina en las AP incubadas con LPS parece apoyar la idea de que la contracción producida por serotonina es bastante resistente a la inducción de la iNOS en las AP [Menendez et al., 2013].

Aunque el papel de iNOS en la VPH es más controvertido, existen también estudios previos que sugieren que la inhibición de iNOS es capaz de preservar parcialmente la VPH durante los procesos asociados a endotoxemia [Ichinose et al., 2003; Spohr et al., 2005; Ullrich et al., 1999]. Sin embargo, esta protección parcial sugiere que el fracaso de la VPH durante la endotoxemia debe estar mediado, al menos en parte, por otros mecanismos distintos a la simple vasodilatación pulmonar como consecuencia del exceso de producción de NO.

Nuestro estudio revela que la activación de la aSMasa representa un nivel adicional de modulación tanto de la VPH como de la disfunción endotelial. Así, el inhibidor de la aSMasa D609 fue capaz no solo de prevenir la disfunción endotelial y la inhibición de la VPH inducidas por el LPS sino que indujo una fuerte potenciación de la VPH en las AP de rata y humano. Aunque desconocemos los mecanismos a través de los cuales la aSMasa modula la función endotelial y la VPH en nuestro sistema, la falta de eficacia del 5 $\alpha$ -7-oxocholesterol para prevenir dichas alteraciones sugiere que estos efectos son independientes de la activación de TAK-1. Durante los últimos años, se han ido acumulando evidencias que sugieren que distintos miembros de la familia de los esfingolípidos pueden modular directamente la producción de NO. De hecho, los esfingolípidos pueden modular la expresión y actividad de la eNOS, y desempeñan un papel importante en su compartimentalización e interacción con moduladores negativos y positivos como Akt o Caveolina-1 [Clementi et al., 2003; Maniatis et al., 2006; Smith et al., 2006]. De forma similar, estudios previos sugieren que la IL-6 es capaz de inhibir la activación de eNOS a través de un mecanismo que parece implicar la inhibición de Akt y la estabilización de la interacción entre eNOS y caveolina-1 [Andreozzi et al., 2007; Garcia-Cardena et al., 1996; Hung et al., 2010]. Puesto que nuestros datos sugieren que tanto la SMasa exógena como la IL-6 son capaces de inducir disfunción endotelial en AP aisladas, si bien con un curso temporal diferente, una posibilidad interesante es que la inducción de aSMasa y la consiguiente producción de IL-6 interfiera con la vía PI3K-Akt y favorezca la interacción entre eNOS y caveolina-1 reduciendo así su actividad y desencadenando la marcada disfunción endotelial presente en las AP tratadas con LPS. Es evidente que esta especulación debe ser contrastada experimentalmente.

En pacientes con SDRA, se considera que la VPH tiene un efecto protector sobre el intercambio gaseoso [Marshall et al., 1994], a pesar de que algunos estudios sugieran que la VPH diseminada pueda contribuir también al incremento de PAP encontrada en estos pacientes [Benzing et al., 1997; Brimiouille et al., 2002; Marshall et al., 1994]. De hecho, a pesar de que tradicionalmente se ha considerado que el SDRA provoca el colapso de los alvéolos y el fracaso de la VPH lo cierto es que las respuestas vasoconstrictoras a la hipoxia muestran gran variabilidad entre los pacientes y modelos experimentales, con estudios mostrando tanto una potenciación [Frank et al., 1996; Griffiths et al., 1997; Liu et al., 1992; Menendez et al., 2013; Zelenkov et al., 1993] como una inhibición de la VPH [Chang et al., 1987; Huttemeier et al., 1982; Schuster et al., 2002; Ullrich et al., 1999; Weir et al., 1976]. Nuestros resultados van en la línea de estos últimos estudios puesto que confirman que la exposición a endotoxina *in vitro* inhibe la VPH en AP aisladas de rata y humano. Asimismo, el hecho de que tanto la dexametasona como el 1400W restauren solo parcialmente la VPH en las AP tratadas con LPS sugiere que, aunque el exceso de NO pueda contribuir a este fracaso [Liu et al., 1991], deben existir mecanismos distintos a la inducción de la iNOS que expliquen este fenómeno [Spohr et al., 2005; Ullrich et al., 1999]. En esta Tesis Doctoral se presentan por primera vez evidencias que sugieren la participación de la aSMasa en el fracaso de la VPH inducido por LPS. Así, los datos presentados revelan que la inhibición de forma crónica de la aSMasa es capaz, no solo de prevenir la inhibición de la VPH por el LPS sino que, la potencia significativamente. Puesto que nuestro grupo ha descrito recientemente que la activación de la nSMasa, y la consiguiente producción de ceramida son eventos tempranos y necesarios en la VPH [Cogolludo et al., 2009a; Frazziano et al., 2011], una posibilidad interesante es que la activación de diferentes isoformas de la SMasa por la hipoxia (nSMasa) y la sepsis (aSMasa) resultara en una inhibición competitiva de los mecanismos de señalización. Además, debemos considerar que la inhibición continuada de la aSMasa por el D609 puede estar modulando los niveles intracelulares de otros esfingolípidos, a parte de la esfingomielina o la ceramida. Así, la inhibición de la SMasa podría favorecer el metabolismo de la esfingomielina por otras vías y dar lugar, por ejemplo, a un aumento de la producción de esfingosilfosforilcolina (SPC). De hecho, esto es lo que aparentemente ocurre en los pacientes con la enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad lisosomal asociada a la deficiencia en aSMasa, que presentan niveles anormalmente elevados de SPC en hígado, bazo o cerebro [Rodriguez-Lafrasse and Vanier, 1999]. Cabe destacar además, que el grupo de

los Dres Philip Aaronson y Jeremy Ward ha descrito recientemente que la SPC es capaz de potenciar la reactividad vascular de las AP a diferentes estímulos a través de la activación de mecanismos implicados en la VPH como son la producción de ERO mediada por las NADPH oxidasas vasculares o la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje [Shaifta et al., 2015; Snetkov et al., 2008]. En cualquier caso, y a pesar de que desconocemos el mecanismo a través del cual el D609 es capaz de potenciar esta respuesta fisiológica, nuestros hallazgos sugieren que la aSMasa podría representar una diana farmacológica que nos permitiría manipular la VPH especialmente en situaciones asociadas a inflamación.

#### **1.4. Efectos de la inhibición de la aSMasa en el modelo de DPA inducido por LPS *in vivo***

Puesto que nuestros datos sugieren que la activación de la aSMasa está implicada no sólo en la respuesta inflamatoria desencadenada por el LPS sino también en el desarrollo de la disfunción endotelial y el aumento de las respuestas contráctiles a serotonina, el siguiente objetivo que nos planteamos fue el de analizar si la inhibición farmacológica de la aSMasa podría ser útil en un modelo *in vivo* de DPA asociado a hipertensión pulmonar.

El LPS es un importante mediador de la sepsis en respuesta a bacterias gram-negativas, y la administración sistémica de LPS fue, de hecho, una de las primeras estrategias utilizadas para demostrar las consecuencias de la sepsis bacteriana. La lesión producida por el LPS *in vivo* parece originarse inicialmente en el endotelio capilar y se desarrolla rápidamente después de su administración [Fujita et al., 1998; Wang et al., 2007]. La respuesta hemodinámica al LPS administrado por vía intravenosa se caracteriza por una fase inicial de leucopenia, disminución del gasto cardíaco, y una caída en la presión arterial sistémica acompañada de un aumento en la presión arterial pulmonar [Taveira da Silva et al., 1993]. La administración intratraqueal de LPS se caracteriza por una mayor infiltración de PMN en los espacios aéreos y un aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias y albúmina en el LBA, principalmente en las primeras 24 horas [Matute-Bello et al., 2008]. Los resultados presentados en el apartado 1.4 confirman que el modelo que hemos utilizado de instilación intratraqueal de LPS reproduce la mayor parte de estas alteraciones, incluyendo el reclutamiento de células inflamatorias (tal y

como evidencia el número de células presentes en LBA, el análisis de la actividad MPO o el análisis histológico), las alteraciones en la permeabilidad vascular (desarrollo de edema y aumento de IgM en LBA), el aumento de la producción de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6) a nivel pulmonar y sistémico o el aumento de la PAP. Nuestros datos confirman además que la administración intratraqueal de LPS induce un aumento en la actividad de la aSMasa pulmonar, a pesar de que no encontramos cambios en sus niveles de expresión.

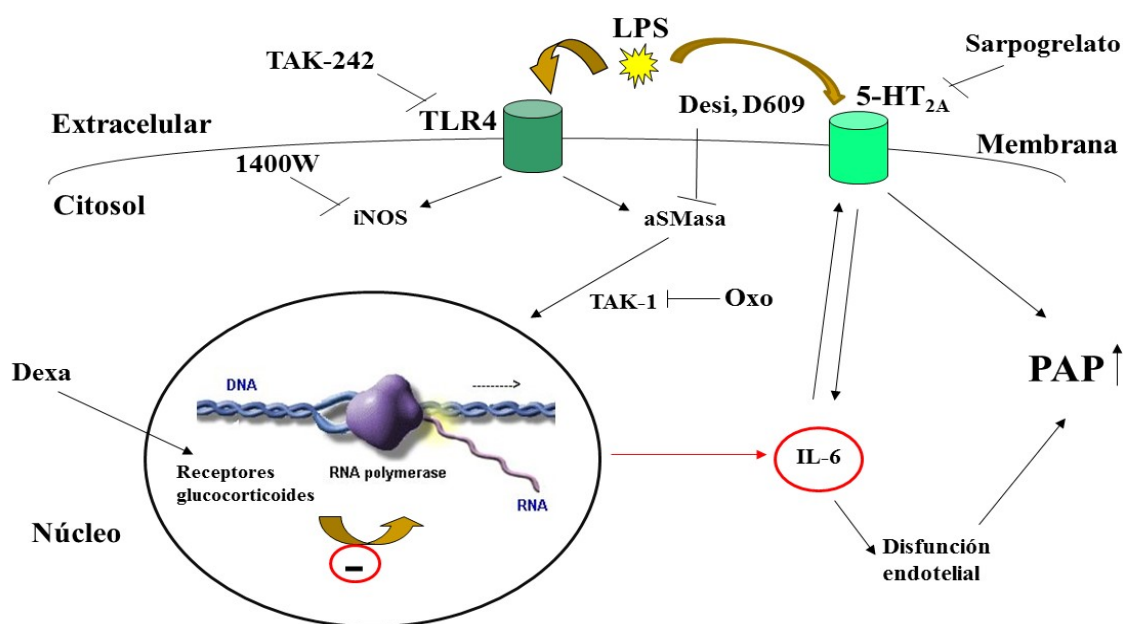
Estos datos contrastan con lo descrito por otros autores en pacientes con sepsis (Claus et al., 2005) o en modelos animales de DPA inducido por PAF [Goggel et al., 2004] en los que el aumento de la actividad de la aSMasa se correlacionaba con un aumento de sus niveles de expresión. Sin embargo, nuestros hallazgos son similares a los descritos por Claus y sus colaboradores [Claus et al., 2005] tras la administración intravenosa de endotoxina a ratones en los que se encontró un aumento de la actividad, pero no de la expresión, de la aSMasa plasmática. Estos autores sugieren que dicho aumento en la actividad de la aSMasa se produciría como consecuencia de modificaciones post-translacionales producidas por el estrés oxidativo asociado a la inflamación sistémica. Puesto que la ceramida es capaz de estimular la producción de ERO en diferentes tipos celulares [Frazziano et al., 2011], el mantenimiento de estas condiciones oxidativas podría actuar como un mecanismo de retroalimentación positiva. Otros mecanismos implicados en el control de la actividad de la aSMasa incluyen lípidos como el fosfatidilinositol, proteínas como las proteínas SAP o modificaciones del pH. En los últimos años, Zeidan y colaboradores han publicado una serie de estudios que demuestran que la actividad de la aSMasa está sometida a regulación por fosforilación a nivel de la serina 508 mediada por la proteína PKC  $\delta$  [Zeidan and Hannun, 2007; Zeidan et al., 2008a; Zeidan et al., 2008b].

Una vez confirmado que el LPS estimula la aSMasa *in vivo*, analizamos los efectos del D609 encontrando que este fármaco no solo inhibía el aumento de la actividad aSMasa pulmonar tras la administración del LPS sino que era capaz de prevenir el aumento de IL-6 en LBA, de la actividad de la MPO en pulmón y limitar el aumento de la PAP. Sin embargo, el desarrollo de edema pulmonar y el aumento en la producción de IL-1 $\beta$  parecen ser resistentes a la inhibición de la aSMasa. Estos resultados parecen estar en completo desacuerdo con el papel de la aSMasa en el edema pulmonar inducido por PAF o LPS descrito por el grupo del Profesor Uhlig [Goggel and Uhlig, 2005] o el



inducido por hemorragia y reperfusión descrito en otro capítulo de esta tesis. Sin embargo, es importante destacar que, a pesar de no alcanzar significación estadística, sí que observamos una tendencia en los animales tratados con D609 a presentar tanto un menor grado de edema (estimado como la relación peso fresco/peso seco) como niveles más bajos de IgM en el LBA. Además, en el estudio de Goggel y colaboradores solo se consiguió una prevención completa del edema al administrar de forma conjunta D609 y ácido acetilsalicílico.

En definitiva, los resultados del modelo de DPA *in vivo* confirman el papel de la aSMasa en la respuesta inflamatoria y la hipertensión pulmonar inducida por el LPS (Diagrama 1) y sugieren que la aSMasa podría ser una diana terapéutica para el tratamiento de la disfunción vascular pulmonar asociada a infecciones bacterianas.



**Diagrama 1.** Esquema de señalización propuesto.

## **2. MODELO DE SHOCK HEMORRÁGICO TRAUMÁTICO**

### **2.1. Cambios hemodinámicos**

El daño de órganos inducido por reperfusión después de un shock hemorrágico se asocia al estrés oxidativo y a un estado inflamatorio sistémico, que provoca un aumento de la mortalidad. No existen en este momento tratamientos eficaces para esta condición. Por ello, el descubrimiento de nuevos tratamientos efectivos tendría un gran impacto en la supervivencia de los pacientes.

En esta Tesis Doctoral se ha demostrado que los inhibidores de esfingomielinasa y quercetina previenen parcialmente la disminución de la actividad de aSMasa inducida por reperfusión en un modelo en rata de shock hemorrágico traumático.

La quercetina, probablemente a través de la inhibición de la liberación de las proteínas nucleares del grupo 1 de alta movilidad (high-mobility group box 1; HMGB1), atenúa la inflamación sistémica y reduce la mortalidad en un modelo de endotoxemia en rata [Tang et al., 2009]. La HMGB1 se identificó originalmente como una proteína nuclear que estabiliza la formación del nucleosoma y también actúa como un factor de transcripción, regulando la expresión de varios genes [Lotze and Tracey, 2005]. La HMGB1 puede ser secretada por las células de la inmunidad innata en respuesta a productos microbianos u otros estímulos inflamatorios [Wang et al., 1999; Yang et al., 2004], puede ser liberada por las células dañadas, y es conocido como uno de los principales patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs) [Seong and Matzinger, 2004]. La HMGB1 fue inicialmente identificada como una citoquina inflamatoria que es un mediador tardío de letalidad en la sepsis [Wang et al., 1999; Yang et al., 2004]. Estudios recientes que sugieren que la HMGB1 también actúa como un mediador precoz de la inflamación contribuyendo al desarrollo de DPA después de un traumatismo/hemorragia [Kim et al., 2005; Peltz et al., 2009; Yang et al., 2006] y daño hepático debido a isquemia-reperfusión hepática [Tsong et al., 2005], nos llevaron a usar este fármaco en nuestro modelo.

La imipramina y el D609 son dos compuestos que, aunque no tengan relación química, son capaces de inhibir la esfingomielinasa ácida. Dado que en algunos estudios se ha

observado que reducen la formación de edema inducido por PAF [Yang et al., 2010], se eligieron estos fármacos para su estudio en esta Tesis Doctoral.

El trauma severo es la principal causa de muerte y discapacidad en todo el mundo [Lozano et al., 2012]. El shock hemorrágico que se produce después de una pérdida muy grave de sangre asociada a trauma resulta en un estado de isquemia tisular. La mortalidad está directamente relacionada con la pérdida masiva de sangre o se produce indirectamente por fallo orgánico múltiple, debido a producción excesiva de ROS, respuesta inflamatoria sistémica, apoptosis y necrosis celular [Collard and Gelman, 2001; Rushing and Britt, 2008]. En particular, la pérdida de la función gastrointestinal, renal, hepática y pulmonar es frecuente después del choque hemorrágico [Badin et al., 2011; Fan, 2010; Hierholzer and Billiar, 2001]. La hemorragia es una emergencia médica que se presenta con frecuencia en las salas de urgencia, en los quirófanos y en la UCI. La pérdida significativa del volumen intravascular puede llevar a inestabilidad hemodinámica, disminución en la perfusión tisular, hipoxia celular, daño de órganos y muerte. El shock ocurre cuando hay hipoperfusión de los órganos vitales. La hipoperfusión puede ser debida a mal funcionamiento del miocardio (shock cardiogénico), infección que conduce a la redistribución del volumen circulante en el espacio extravascular (shock séptico), o hipovolemia por severa deshidratación o hemorragia (shock hipovolémico).

Se han establecido modelos diferentes de shock hemorrágico y reanimación, pero ninguno de ellos abarca todos los aspectos importantes relacionados con la realidad clínica [Russell et al., 1995; Yang et al., 2006; Zhong et al., 1999]. Un breve período de hipotensión grave (PAM menor de 25-35 mmHg durante 20 minutos) no se traduce en daño mortal de órganos y no es clínicamente relevante [Stein et al., 1990]. Nuestro protocolo experimental de inducción de trauma dentro de los primeros 15 minutos, de shock hemorrágico de 75 minutos y de posterior reanimación durante 20-30 minutos, se orienta hacia la clínica humana y refleja de manera realista la mayor parte de las situaciones de emergencia [Husmann et al., 2011]. En vista de la reproducibilidad y fiabilidad experimental, los modelos de presión fija son superiores a los de volumen fijo. En modelos animales de presión fija, el shock hemorrágico se realiza mediante la extracción de sangre hasta que la presión arterial deseada sea alcanzada. Durante el período de shock, la presión de la sangre es mantenida en este valor a través de otra

extracción o reinfusión de sangre, como se ha realizado en nuestro modelo animal de shock hemorrágico traumático en rata. El volumen de sangre circulante de los mamíferos no se correlaciona estrictamente con el peso corporal y no aumenta linealmente con el aumento del peso del cuerpo, debido a las diferencias individuales en la relación de volumen de sangre/masa de tejido adiposo y muscular. Por ejemplo, los animales más pesados suelen tener más grasa y comparativamente menos sangre. Por lo tanto, a diferencia de los modelos de presión fija, los modelos de volumen fijo (que se basan en el peso corporal) producen disminuciones variables en la presión arterial media (PAM) y así, en la intensidad del shock hemorrágico.

En nuestro modelo de presión fija, se observó que el trauma producido por laparotomía indujo una reducción significativa de la presión arterial y a partir de los primeros 15-30 minutos de la fase de shock, se consiguió una hipotensión significativa mediante la extracción de sangre hasta el valor de presión planteado de 35 mmHg, que fue mantenido durante todo el periodo de shock (30-90 minutos).

Actualmente, para el tratamiento no quirúrgico de shock hemorrágico, se recomienda una rápida reanimación mediante el uso de cristaloides para restaurar el volumen intravascular y el gasto cardíaco [Finfer et al., 2010; Rossaint et al., 2006]. De hecho, en nuestro protocolo, al finalizar el shock hemorrágico, se rescataron los animales por la reinfusión de la sangre extraída con el mismo volumen de Ringer Lactato para restaurar la presión a los valores pre-shock, a través de la vena yugular y una bomba de infusión. Shires y sus colaboradores [Shires et al., 1964] han demostrado en preparaciones experimentales que se necesitan, además de la sangre, fluidos cristaloides (Ringer Lactato o solución salina normal) para restaurar la perfusión y, de hecho, su uso está recomendado por el Colegio Americano de Cirujanos (American College of Surgeons, 1997). Los cristaloides son soluciones de electrolitos administrados por vía intravenosa. Las ventajas de estas soluciones incluyen la disponibilidad, la seguridad, y el bajo coste bajo [Falk et al., 1992; Shires et al., 1995]. La principal desventaja de usar soluciones cristaloides es su rápido movimiento del espacio intravascular hacia el espacio extravascular, así que se necesita administrarlas más veces [Gould et al., 1993; Lucas, 1990] y hay el riesgo de provocar edema pulmonar [Davies, 1989]. Entre las soluciones cristaloides, se prefiere el Ringer lactato a la solución salina normal para evitar acidosis hiperclorémica asociada con el uso prolongado de soluciones ricas en sodio [Dubick and Wade, 1994; Vassar et al., 1993]. Sin embargo, esta práctica es controvertida porque la

restauración agresiva del volumen intravascular con un rápido aumento en la presión sanguínea, antes de controlar la hemorragia, puede conducir a un aumento de la mortalidad [Hussmann et al., 2011]. Por lo tanto, se ha propuesto la reanimación controlada con líquidos en pequeños volúmenes antes de parar el sangrado [Barrantes et al., 2008]. En nuestros experimentos, el protocolo de administración del fármaco al inicio de la reanimación se orientó también clínicamente, con el fin de analizar los efectos potenciales para prevenir el daño por reperfusión en la UCI. La reperfusión produjo una hipertensión transitoria inicial durante el período de la reinfusión de la sangre con Ringer lactato. Ésto fue seguido por los eventos característicos de shock asociado a daño de órganos, como una fase hipotensiva e hipoxemia. La quercetina impidió la fase hipertensiva, pero no corrigió la hipoxemia e hipotensión inducidas por el shock y la reperfusión. En cambio, la hipotensión se previno parcialmente en los grupos de D609 e imipramina con valores de presión que no fueron significativamente distintos de los del grupo sham.

En el shock hemorrágico, una pérdida aguda en el volumen de sangre conduce a una compensación simpática mediada por la vasoconstricción periférica, taquicardia y aumento de la contractilidad miocárdica, que a su vez aumenta la demanda miocárdica de oxígeno, a un nivel que no puede ser mantenida. Cuando la función de bomba del corazón se haya deprimida, se ponen en marcha una serie de mecanismos compensadores para tratar de mantener el gasto cardíaco y asegurar el riego de los órganos jerárquicamente superiores (circulación coronaria y cerebral). En esta redistribución juega un papel importante la vasoconstricción mediada por el sistema nervioso simpático. Simultáneamente, la hipoperfusión tisular derivada de la vasoconstricción precapilar conduce a metabolismo anaeróbico y acidosis [Marzi, 1997]. La hipoxia tisular, acidosis y la liberación de mediadores diferentes conducen a una respuesta inflamatoria sistémica [Falk et al., 1992; Marzi, 1997]. El paso inicial en cualquier reanimación del paciente es asegurar entonces una vía aérea y permitir una oxigenación adecuada. En cuanto a la frecuencia cardíaca, aunque nos esperábamos observar un aumento, se encontró un aumento solo en algunos animales durante los 35-90 minutos, antes de poner los fármacos mientras que en la fase de reperfusión fue similar en todos los grupos. La mortalidad en el grupo shock fue relativamente baja, alrededor de un 30% y se observó una tendencia no significativa a que los fármacos,

especialmente la quercetina (15%), seguida de la imipramina (23%) y del D609 (25%), aumentarían la supervivencia.

## 2.2. Alteraciones de electrolitos, hematocrito y hemoglobina

Como ya hemos comentado anteriormente, la reducción del volumen sanguíneo, de la presión sanguínea y del gasto cardíaco debidos a la hemorragia severa dan lugar a la disminución de la perfusión tisular y de la liberación de oxígeno [Gutierrez et al., 2004; Torres Filho et al., 2010; Tung et al., 1976]. Posteriormente, hay un aumento en el metabolismo anaeróbico que eleva el lactato y disminuye el bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), lo que resulta en acidosis metabólica y reducción de pH [Tung et al., 1976]. Puesto que la liberación de oxígeno disminuye, las células que sufren hipoxia activan la glucólisis anaeróbica, que se refleja por el aumento de la concentración de lactato en sangre después de la hemorragia grave [Torres Filho et al., 2010; Torres et al., 2004]. En nuestro estudio, no se midió la concentración de lactato pero se determinó el exceso de bases (BE), un índice que representa la diferencia entre la cantidad total de base tampón que el sujeto tiene y lo que debería tener, siendo el valor normal  $0 \pm 3$  mEq/L. Cuando el BE baja, se debe a una acidosis metabólica. Estudios recientes sobre roedores sometidos a hemorragia demostraron que los supervivientes tenían un BE mayor respecto a los no supervivientes [Kerger et al., 1996; Torres Filho et al., 2010]. El BE calculado refleja los efectos combinados de las concentraciones de bicarbonato y  $\text{H}^+$  en sangre. Una disminución en el BE está estrechamente asociada con el aumento de la demanda de oxígeno [Rixen et al., 2001; Rixen and Siegel, 2005], que es la cantidad de oxígeno consumido por encima de los niveles de reposo después del ejercicio y se ha utilizado como un predictor de la mortalidad después de la hemorragia [Davis et al., 1998; Krishna et al., 1998; Rixen and Siegel, 2005]. En nuestro modelo, confirmando lo descrito anteriormente, los animales desarrollaron acidosis metabólica con una disminución significativa en el pH, exceso de bases y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) después del shock hemorrágico, aunque no se encontraron cambios en la saturación del oxígeno y paradójicamente la presión parcial de  $\text{O}_2$  resultó más alta en el grupo shock respecto al grupo sham.

Los iones de bicarbonato constituyen uno de los tampones más importantes en la sangre [Petronis, 2010] y sus concentraciones están estrechamente relacionadas con el dióxido

de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en la sangre. En combinación, la presión parcial de  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ) y el  $\text{HCO}_3^-$  se utilizan para calcular la concentración total de  $\text{CO}_2$  ( $\text{TCO}_2$ ). De hecho, los resultados presentados mostraron una disminución significativa en el bicarbonato y ningún cambio en la  $\text{pCO}_2$  en el grupo shock, pero se observó una reducción significativa en la  $\text{TCO}_2$  con valores ligeramente superiores a los del  $\text{HCO}_3^-$ .

Según trabajos recientes, a nivel tisular y en la sangre venosa se puede producir bien, un aumento de la  $\text{pCO}_2$  durante la hemorragia grave [Marik, 2006; Sato et al., 1998; Van der Linden et al., 1995] o bien una disminución [Hannon et al., 1990; Torres Filho et al., 2010; Torres et al., 2004], debida probablemente a la hiperventilación que se produce como un mecanismo de compensación respiratoria para neutralizar la acidosis metabólica [Rose et al., 2013]. Aunque en nuestros experimentos no hubo una variación en la  $\text{pCO}_2$  respecto al grupo sham, la concentración total del dióxido de carbono resultó disminuida, confirmando la presencia de acidosis metabólica característica del shock hemorrágico.

Al final del período de reperfusión, se restablecieron los valores de pH, exceso de bases, bicarbonato y  $\text{TCO}_2$  en el grupo de shock, pero los animales desarrollaron hipoxemia con una disminución significativa en la  $\text{pO}_2$  y una tendencia similar en la  $\text{SO}_2$ . Los fármacos no revirtieron la hipoxemia inducida por el shock y la reperfusión.

Recientemente, se ha demostrado que la acidosis metabólica inducida por hemorragia afecta la homeostasis del potasio y aumenta su concentración en la sangre [Torres Filho et al., 2010], que puede causar la muerte [Torres et al., 2004]. Asimismo, nuestros datos mostraron un aumento del  $\text{K}^+$  al final de la fase de shock respecto al grupo sham. La hiperpotasemia que se produce puede también tener efectos adversos sobre las funciones cardiovasculares y neuromusculares [Schaefer and Wolford, 2005; Terkildsen et al., 2007]. La actividad de la  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$  se sabe que está alterada en condiciones isquémicas, resultando en un aumento del eflujo de potasio a través de la membrana celular o una reducción de su entrada. En última instancia, hay evidencias de que una disminución de  $\text{K}^+$  causa apoptosis [Yu, 2003]. Aunque en nuestro modelo el potasio resultó incrementado después de la hemorragia, la concentración del sodio disminuyó, coincidiendo con algunos estudios [Day and Friedman, 1980; Torres Filho et al., 2010],

pero no con otros [Coleman and Glaviano, 1964]. Entre los electrolitos, el calcio no cambió al final de la fase de shock. El calcio ionizado tiene funciones múltiples y su alteración (hipocalcemia o hipercalcemia) se asocia con una mayor mortalidad en pacientes en estado crítico [Egi et al., 2011]. Sin embargo, no hay diferencias tempranas en los niveles de calcio entre los sobrevivientes y no sobrevivientes sea en ratas [Torres Filho et al., 2010] como en humanos [Kaplan and Kellum, 2004]. En un estudio, las diferencias en la concentración de calcio se observa después de 3 días de trauma [Ward et al., 2004]. De acuerdo con estos estudios, no encontramos ninguna diferencia en el calcio ionizado entre el grupo sham y shock.

Como era esperable, durante la fase de shock se produjo también anemia, como consecuencia de la hemorragia con descenso de hemoglobina (Hb) y hematocrito. La hiponatremia, hiperpotasemia y la anemia se revirtieron tras la reinfusión de sangre más Ringer Lactato.

### **2.3. Inflamación y permeabilidad vascular**

El shock hemorrágico inicia una respuesta inflamatoria caracterizada por la regulación positiva de la expresión de citoquinas y la acumulación de neutrófilos en tejidos diferentes. Estos cambios son prominentes en pulmones e hígado y probablemente contribuyen al daño tisular y a la disfunción después del shock. Los mecanismos por los cuales la hemorragia desencadena esta respuesta inflamatoria permanecen poco conocidos. Además de la liberación sistémica de agentes proinflamatorios, también las ERO se producen tras isquemia/reperfusión. Estudios recientes sugieren que el aumento de la producción de NO es el resultado de un aumento de la expresión de iNOS que contribuiría a la señalización proinflamatoria en estado de shock hemorrágico. La isquemia global y la respuesta inflamatoria en shock hemorrágico son los eventos iniciales de activación para el desarrollo del SDRA, una causa importante de muerte en los pacientes de trauma. Además de la infiltración leucocitaria polimorfonuclear en el espacio alveolar y de la producción de citoquinas, se observa también daño alveolar-capilar y epitelial y formación de edema pulmonar.

El modelo descrito en esta Tesis Doctoral se asocia, al final del período de reperfusión, con hipotensión, hipoxemia, edema pulmonar, aumento de la permeabilidad vascular



pulmonar y 30 % de mortalidad. Sin embargo, encontramos pequeños cambios en los marcadores inflamatorios, ninguna evidencia histológica de la lesión pulmonar aguda con las características membranas hialinas y ni translocación bacteriana. El edema pulmonar se demostró por un incremento en la proporción peso pulmonar fresco/peso pulmonar seco (Pf/Ps) en el grupo shock y esto se acompañó por un aumento de las proteínas totales en LBA. Sin embargo, los marcadores de inflamación como la mieloperoxidasa, IL-6 en LBA y en plasma y la infiltración de células en LBA fueron similares en los grupos shock y sham. Todos los fármacos previnieron la formación de edema. Los flavonoides se describieron inicialmente, en los años 1930-1950, como protectores de la permeabilidad de los capilares vasculares [Rusznayak et al., 1936]. Además, evidencias recientes demuestran que en el DPA inducido por ácido o por lavado broncoalveolar repetido, el tratamiento con D609 o imipramina atenúa el edema pulmonar y mejora la oxigenación [Goggel et al., 2004; von Bismarck et al., 2008]. Esto explica el efecto preventivo de los fármacos sobre el edema inducido por reperfusión. Sin embargo, los cambios en las proteínas totales en LBA no fueron inhibidos por la quercetina y el D609, pero sí por la imipramina, mientras que el aumento de la IgM se previno por ambos inhibidores de la aSMasa.

Como se ha descrito en la introducción de esta Tesis, hay evidencias de que los esfingolípidos podrían ser una diana terapéutica en el SDRA [Tibboel et al., 2014]. Se ha demostrado que la activación de la aSMasa y el aumento de los niveles de ceramida desempeñan un papel en el daño pulmonar agudo inducido por LPS (presente Tesis Doctoral), por PAF [Goggel et al., 2004] y por fracaso del surfactante [von Bismarck et al., 2008]. En esta Tesis Doctoral se presenta por primera vez una mayor actividad de la aSMasa en homogenizado de pulmón sometido a shock hemorrágico y traumático y reperfusión, confirmando que la activación de la aSMasa es una característica común de los modelos animales de daño pulmonar agudo. Por otra parte, la inhibición de la aSMasa previene la lesión pulmonar aguda causada por PAF [Goggel et al., 2004] o lavados repetidos de la vía aérea [von Bismarck et al., 2008]. También se encontró que todos los fármacos impidieron el aumento de la actividad de aSMasa en pulmón. Por lo tanto, estos datos sugieren que la inhibición de la aSMasa es un mecanismo potencial de protección de órganos por los fármacos utilizados en esta Tesis Doctoral. De todas formas, la escasa presencia de marcadores inflamatorios y la ausencia de evidencias histológicas y de translocación bacteriana nos sugiere que el modelo de shock

hemorrágico traumático realizado en esta tesis doctoral indujo un daño pulmonar leve. Posiblemente por esta razón los fármacos empleados presentaron un efecto protector parcial.



## **CONCLUSIONES**



1. La exposición a LPS induce una activación de la aSMasa en el músculo liso vascular pulmonar, aumentando la síntesis de ceramida. La exposición a SMasa exógena reproduce muchos de los efectos del LPS incluyendo la producción de IL-6, la hiperrespuesta vascular a la 5-HT, la disfunción endotelial y la inhibición de la VPH.
2. La activación de la aSMasa por el LPS está implicada en la producción de IL-6 a través de un mecanismo sensible a glucocorticoides en el que intervienen la TAK-1 y los receptores de serotonina 5HT<sub>2A</sub>, pero independiente de iNOS.
3. La inhibición de la VPH y la disfunción endotelial inducida por el LPS tanto en arterias pulmonares de rata como en humanas implica la activación de la aSMasa, es sensible a glucocorticoides e inhibidores de la iNOS pero independiente de TAK-1.
4. La hiperrespuesta vascular a serotonina inducida por LPS es dependiente de la aSMasa y de TAK-1, es parcialmente sensible a glucocorticoides e independiente de iNOS. El LPS produce también una hiporrespuesta vascular a fenilefrina que no se reproduce por SMasa exógena.
5. La administración intratraqueal de LPS aumenta la actividad pulmonar de la aSMasa. Este efecto está implicado en el aumento de IL-6 en LBA, de la actividad de la MPO en pulmón y de la PAP. Sin embargo, el desarrollo de edema pulmonar y el aumento en la producción de IL-1 $\beta$  en LBA, son independientes de la aSMasa.
6. En el modelo de shock hemorrágico traumático se produce un aumento de la actividad de aSMasa. La quercetina y los inhibidores de la aSMasa imipramina y D609 previenen parcialmente la hipotensión, la alteración de la permeabilidad capilar pulmonar y el desarrollo de edema pulmonar, mientras que ninguno de los fármacos previene la hipoxemia.
7. En conjunto, la aSMasa es una nueva vía de señalización del LPS implicada en procesos inflamatorios y en disfunción vascular pulmonar. Los resultados de esta Tesis Doctoral sugieren que la aSMasa podría representar una posible diana terapéutica en el DPA asociado a sepsis bacteriana o shock hemorrágico traumático.



## **BIBLIOGRAFÍA**





- Abe A, Karaki H: Mechanisms underlying the inhibitory effect of dibutyryl cyclic amp in vascular smooth muscle. *European journal of pharmacology* 1992;211:305-311.
- Abrams ST, Zhang N, Manson J, Liu T, Dart C, Baluwa F, Wang SS, Brohi K, Kipar A, Yu W, Wang G, Toh CH: Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013;187:160-169.
- Adam D, Heinrich M, Kabelitz D, Schutze S: Ceramide: Does it matter for t cells? *Trends in immunology* 2002;23:1-4.
- Adhikari NK, Burns KE, Friedrich JO, Granton JT, Cook DJ, Meade MO: Effect of nitric oxide on oxygenation and mortality in acute lung injury: Systematic review and meta-analysis. *Bmj* 2007;334:779.
- Alemany R, van Koppen CJ, Danneberg K, Ter Braak M, Meyer Zu Heringdorf D: Regulation and functional roles of sphingosine kinases. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2007;374:413-428.
- Alhazzani W, Alshahrani M, Jaeschke R, Forel JM, Papazian L, Sevransky J, Meade MO: Neuromuscular blocking agents in acute respiratory distress syndrome: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical care* 2013;17:R43.
- Allende ML, Proia RL: Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochimica et biophysica acta* 2002;1582:222-227.
- Allende ML, Yamashita T, Proia RL: G-protein-coupled receptor s1p1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* 2003;102:3665-3667.
- Altemeier WA, Matute-Bello G, Frevert CW, Kawata Y, Kajikawa O, Martin TR, Glenny RW: Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004;287:L533-542.
- Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY, Maceyka M, Jiang H, Luo C, Kordula T, Milstien S, Spiegel S: Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the e3 ubiquitin ligase traf2. *Nature* 2010;465:1084-1088.
- Aman J, van der Heijden M, van Lingen A, Girbes AR, van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VW, Groeneveld AB: Plasma protein levels are markers of pulmonary vascular permeability and degree of lung injury in critically ill patients with or at risk for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine* 2011;39:89-97.
- Andreozzi F, Laratta E, Procopio C, Hribal ML, Sciacqua A, Perticone M, Miele C, Perticone F, Sesti G: Interleukin-6 impairs the insulin signaling pathway, promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells. *Molecular and cellular biology* 2007;27:2372-2383.
- Andrieu-Abadie N, Gouaze V, Salvayre R, Levade T: Ceramide in apoptosis signaling: Relationship with oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 2001;31:717-728.
- Annane D: Glucocorticoids for ards: Just do it! *Chest* 2007;131:945-946.
- Archer SL, Huang J, Henry T, Peterson D, Weir EK: A redox-based o2 sensor in rat pulmonary vasculature. *Circulation research* 1993;73:1100-1112.
- Armstrong L, Millar AB: Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 1997;52:442-446.
- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE: Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2:319-323.
- Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R: Intracellular ph and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circulation research* 1996;78:750-758.

- Azamfirei L, Gurzu S, Solomon R, Copotoiu R, Copotoiu S, Jung I, Tilinca M, Branzaniuc K, Corneci D, Szederjesi J, Kovacs J: Vascular endothelial growth factor: A possible mediator of endothelial activation in acute respiratory distress syndrome. *Minerva anesthesiologica* 2010;76:609-616.
- Azghani AO, Miller EJ, Peterson BT: Virulence factors from *pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung* 2000;178:261-269.
- Badin J, Boulain T, Ehrmann S, Skarzynski M, Bretagnol A, Buret J, Benzekri-Lefevre D, Mercier E, Runge I, Garot D, Mathonnet A, Dequin PF, Perrotin D: Relation between mean arterial pressure and renal function in the early phase of shock: A prospective, explorative cohort study. *Critical care* 2011;15:R135.
- Bajwa EK, Khan UA, Januzzi JL, Gong MN, Thompson BT, Christiani DC: Plasma c-reactive protein levels are associated with improved outcome in ards. *Chest* 2009;136:471-480.
- Bandhuvula P, Saba JD: Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: Silencing the siren. *Trends in molecular medicine* 2007;13:210-217.
- Barrantes F, Tian J, Vazquez R, Amoateng-Adjepong Y, Manthous CA: Acute kidney injury criteria predict outcomes of critically ill patients. *Critical care medicine* 2008;36:1397-1403.
- Bartelsen O, Lansmann S, Nettersheim M, Lemm T, Ferlinz K, Sandhoff K: Expression of recombinant human acid sphingomyelinase in insect sf21 cells: Purification, processing and enzymatic characterization. *Journal of biotechnology* 1998;63:29-40.
- Bartke N, Hannun YA: Bioactive sphingolipids: Metabolism and function. *Journal of lipid research* 2009;50 Suppl:S91-96.
- Bem RA, Domachowske JB, Rosenberg HF: Animal models of human respiratory syncytial virus disease. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;301:L148-156.
- Benzing A, Mols G, Brieschal T, Geiger K: Hypoxic pulmonary vasoconstriction in nonventilated lung areas contributes to differences in hemodynamic and gas exchange responses to inhalation of nitric oxide. *Anesthesiology* 1997;86:1254-1261.
- Berger G, Guetta J, Klorin G, Badarneh R, Braun E, Brod V, Saleh NA, Katz A, Bitterman H, Azzam ZS: Sepsis impairs alveolar epithelial function by downregulating na-k-atpase pump. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;301:L23-30.
- Bertok S, Wilson MR, Dorr AD, Dokpesi JO, O'Dea KP, Marczin N, Takata M: Characterization of tnfr receptor subtype expression and signaling on pulmonary endothelial cells in mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;300:L781-789.
- Bertozi P, Astedt B, Zenzius L, Lynch K, LeMaire F, Zapol W, Chapman HA, Jr.: Depressed bronchoalveolar urokinase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 1990;322:890-897.
- Bhorade S, Christenson J, O'Connor M, Lavoie A, Pohlman A, Hall JB: Response to inhaled nitric oxide in patients with acute right heart syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1999;159:571-579.
- Bigatello LM, Hurford WE, Kacmarek RM, Roberts JD, Jr., Zapol WM: Prolonged inhalation of low concentrations of nitric oxide in patients with severe adult respiratory distress syndrome. Effects on pulmonary hemodynamics and oxygenation. *Anesthesiology* 1994;80:761-770.
- Birukova AA, Chatchavalvanich S, Rios A, Kawkitinarong K, Garcia JG, Birukov KG: Differential regulation of pulmonary endothelial monolayer integrity by varying degrees of cyclic stretch. *The American journal of pathology* 2006;168:1749-1761.
- Blazquez C, Galve-Roperh I, Guzman M: De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *FASEB*

- journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2000;14:2315-2322.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA: Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994;368:850-853.
- Bourbon NA, Sandirasegarane L, Kester M: Ceramide-induced inhibition of akt is mediated through protein kinase  $\zeta$ : Implications for growth arrest. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:3286-3292.
- Bouros D, Alexandrakis MG, Antoniou KM, Agouridakis P, Pneumatikos I, Anevlavis S, Pataka A, Patlakas G, Karkavitsas N, Kyriakou D: The clinical significance of serum and bronchoalveolar lavage inflammatory cytokines in patients at risk for acute respiratory distress syndrome. *BMC pulmonary medicine* 2004;4:6.
- Brenner B, Ferlinz K, Grassme H, Weller M, Koppenhoefer U, Dichgans J, Sandhoff K, Lang F, Gulbins E: Fas/cd95/apo-i activates the acidic sphingomyelinase via caspases. *Cell death and differentiation* 1998;5:29-37.
- Brimiouille S, Julien V, Gust R, Kozlowski JK, Naeije R, Schuster DP: Importance of hypoxic vasoconstriction in maintaining oxygenation during acute lung injury. *Critical care medicine* 2002;30:874-880.
- Brimiouille S, LeJeune P, Naeije R: Effects of hypoxic pulmonary vasoconstriction on pulmonary gas exchange. *Journal of applied physiology* 1996;81:1535-1543.
- Broglie P, Matsumoto K, Akira S, Brautigan DL, Ninomiya-Tsuji J: Transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1 (tak1) kinase adaptor, tak1-binding protein 2, plays dual roles in tak1 signaling by recruiting both an activator and an inhibitor of tak1 kinase in tumor necrosis factor signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 2010;285:2333-2339.
- Brown DA, London E: Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology* 1998;14:111-136.
- Brunet F, Belghith M, Mira JP, Lanore JJ, Vaxelaire JF, Dall'ava Santucci J, Dhainaut JF: Extracorporeal carbon dioxide removal and low-frequency positive-pressure ventilation. Improvement in arterial oxygenation with reduction of risk of pulmonary barotrauma in patients with adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1993;104:889-898.
- Buchackert Y, Rummel S, Vohwinkel CU, Gabrielli NM, Grzesik BA, Mayer K, Herold S, Morty RE, Seeger W, Vadasz I: Megalin mediates transepithelial albumin clearance from the alveolar space of intact rabbit lungs. *The Journal of physiology* 2012;590:5167-5181.
- Buckley ST, Medina C, Kasper M, Ehrhardt C: Interplay between  $\alpha_5\beta_1$  integrin, cd44, and focal adhesion molecules in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;300:L548-559.
- Bull TM, Clark B, McFann K, Moss M, National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute AN: Pulmonary vascular dysfunction is associated with poor outcomes in patients with acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010;182:1123-1128.
- Bulotta S, Barsacchi R, Rotiroli D, Borgese N, Clementi E: Activation of the endothelial nitric-oxide synthase by tumor necrosis factor- $\alpha$ . A novel feedback mechanism regulating cell death. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:6529-6536.
- Burgess JK, Weckmann M: Matrikines and the lungs. *Pharmacology & therapeutics* 2012;134:317-337.
- Burnham EL, Janssen WJ, Riches DW, Moss M, Downey GP: The fibroproliferative response in acute respiratory distress syndrome: Mechanisms and clinical significance. *The European respiratory journal* 2014;43:276-285.
- Burnham EL, McCord JM, Bose S, Brown LA, House R, Moss M, Gaydos J: Protandim does not influence alveolar epithelial permeability or intrapulmonary oxidative stress in human subjects with alcohol use disorders. *American*

- journal of physiology Lung cellular and molecular physiology 2012;302:L688-699.
- Cakarova L, Marsh LM, Wilhelm J, Mayer K, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S: Macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Impact on alveolar epithelial repair. American journal of respiratory and critical care medicine 2009;180:521-532.
- Calfee CS, Eisner MD, Parsons PE, Thompson BT, Conner ER, Jr., Matthay MA, Ware LB, Network NARDSCT: Soluble intercellular adhesion molecule-1 and clinical outcomes in patients with acute lung injury. Intensive care medicine 2009;35:248-257.
- Calfee CS, Ware LB, Eisner MD, Parsons PE, Thompson BT, Wickersham N, Matthay MA, Network NA: Plasma receptor for advanced glycation end products and clinical outcomes in acute lung injury. Thorax 2008;63:1083-1089.
- Callahan JW, Jones CS, Davidson DJ, Shankaran P: The active site of lysosomal sphingomyelinase: Evidence for the involvement of hydrophobic and ionic groups. Journal of neuroscience research 1983;10:151-163.
- Canals D, Roddy P, Hannun YA: Protein phosphatase 1 $\alpha$  mediates ceramide-induced erm protein dephosphorylation: A novel mechanism independent of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (pip2) and myosin/erm phosphatase. The Journal of biological chemistry 2012;287:10145-10155.
- Cartwright N, McMaster SK, Sorrentino R, Paul-Clark M, Sriskandan S, Ryffel B, Quesniaux VF, Evans TW, Mitchell JA: Elucidation of toll-like receptor and adapter protein signaling in vascular dysfunction induced by gram-positive staphylococcus aureus or gram-negative escherichia coli. Shock 2007a;27:40-47.
- Cartwright N, Murch O, McMaster SK, Paul-Clark MJ, van Heel DA, Ryffel B, Quesniaux VF, Evans TW, Thiernemann C, Mitchell JA: Selective nod1 agonists cause shock and organ injury/dysfunction in vivo. American journal of respiratory and critical care medicine 2007b;175:595-603.
- Castillo SS, Levy M, Thaikoottathil JV, Goldkorn T: Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells. Experimental cell research 2007;313:2680-2686.
- Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, Nguyen JX, Marques MB, Monestier M, Toy P, Werb Z, Looney MR: Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. The Journal of clinical investigation 2012;122:2661-2671.
- Chadda K, Annane D: The use of corticosteroids in severe sepsis and acute respiratory distress syndrome. Annals of medicine 2002;34:582-589.
- Chalfant CE, Spiegel S: Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: Expanding roles in cell signaling. Journal of cell science 2005;118:4605-4612.
- Chandel NS, Budinger GR, Mutlu GM, Varga J, Synenki L, Donnelly HK, Zirk A, Eisenbart J, Jovanovic B, Jain M: Keratinocyte growth factor expression is suppressed in early acute lung injury/acute respiratory distress syndrome by smad and c-abl pathways. Critical care medicine 2009;37:1678-1684.
- Chang SW, Feddersen CO, Henson PM, Voelkel NF: Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. The Journal of clinical investigation 1987;79:1498-1509.
- Chang TM, Varma R: Effect of a single replacement of one of ringer lactate, hypertonic saline/dextran, 7g% albumin, stroma-free hemoglobin, o-raffinose polyhemoglobin or whole blood on the long term survival of unanesthetized rats with lethal hemorrhagic shock after 67% acute blood loss. Biomaterials, artificial cells, and immobilization biotechnology : official journal of the International Society for Artificial Cells and Immobilization Biotechnology 1992;20:503-510.

- Chang Y, Abe A, Shayman JA: Ceramide formation during heat shock: A potential mediator of alpha b-crystallin transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:12275-12279.
- Chaouat A, Savale L, Chouaid C, Tu L, Sztrymf B, Canuet M, Maitre B, Housset B, Brandt C, Le Corvoisier P, Weitzenblum E, Eddahibi S, Adnot S: Role for interleukin-6 in copd-related pulmonary hypertension. *Chest* 2009;136:678-687.
- Chatterjee S, Premachandran S, Shukla J, Poduval TB: Synergistic therapeutic potential of dexamethasone and l-arginine in lipopolysaccharide-induced septic shock. *The Journal of surgical research* 2007;140:99-108.
- Chen W, Sammani S, Mitra S, Ma SF, Garcia JG, Jacobson JR: Critical role for integrin-beta4 in the attenuation of murine acute lung injury by simvastatin. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;303:L279-285.
- Cheng IW, Ware LB, Greene KE, Nuckton TJ, Eisner MD, Matthay MA: Prognostic value of surfactant proteins a and d in patients with acute lung injury. *Critical care medicine* 2003;31:20-27.
- Chesnutt AN, Matthay MA, Tibayan FA, Clark JG: Early detection of type iii procollagen peptide in acute lung injury. Pathogenetic and prognostic significance. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997;156:840-845.
- Chimenti L, Luque T, Bonsignore MR, Ramirez J, Navajas D, Farre R: Pre-treatment with mesenchymal stem cells reduces ventilator-induced lung injury. *The European respiratory journal* 2012;40:939-948.
- Cioffi DL, Pandey S, Alvarez DF, Cioffi EA: Terminal sialic acids are an important determinant of pulmonary endothelial barrier integrity. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;302:L1067-1077.
- Clark JG, Milberg JA, Steinberg KP, Hudson LD: Type iii procollagen peptide in the adult respiratory distress syndrome. Association of increased peptide levels in bronchoalveolar lavage fluid with increased risk for death. *Annals of internal medicine* 1995;122:17-23.
- Claus RA, Bunck AC, Bockmeyer CL, Brunkhorst FM, Losche W, Kinscherf R, Deigner HP: Role of increased sphingomyelinase activity in apoptosis and organ failure of patients with severe sepsis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2005;19:1719-1721.
- Clementi E, Borgese N, Meldolesi J: Interactions between nitric oxide and sphingolipids and the potential consequences in physiology and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:518-523.
- Clerici C: The challenge of modeling human acute respiratory distress syndrome: A new model of lung injury due to sepsis with impaired alveolar edema fluid removal. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;301:L20-22.
- Cogolludo A, Moreno L, Frazziano G, Moral-Sanz J, Menendez C, Castaneda J, Gonzalez C, Villamor E, Perez-Vizcaino F: Activation of neutral sphingomyelinase is involved in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovascular research* 2009a;82:296-302.
- Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Frazziano G, Cobeno L, Tamargo J, Perez-Vizcaino F: Serotonin inhibits voltage-gated k+ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: Role of 5-ht2a receptors, caveolin-1, and kv1.5 channel internalization. *Circulation research* 2006;98:931-938.
- Cogolludo AL, Moral-Sanz J, van der Sterren S, Frazziano G, van Cleef AN, Menendez C, Zoer B, Moreno E, Roman A, Perez-Vizcaino F, Villamor E: Maturation of o2 sensing and signaling in the chicken ductus arteriosus. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2009b;297:L619-630.

- Cohen MJ, Brohi K, Calfee CS, Rahn P, Chesebro BB, Christiaans SC, Carles M, Howard M, Pittet JF: Early release of high mobility group box nuclear protein 1 after severe trauma in humans: Role of injury severity and tissue hypoperfusion. *Critical care* 2009;13:R174.
- Coleman B, Glaviano VV: Electrolyte and water distribution in the heart in irreversible hemorrhagic shock. *The American journal of physiology* 1964;207:352-356.
- Coleman RA, Smith WL, Narumiya S: International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacological reviews* 1994;46:205-229.
- Collaboration IRGCERF, Sarwar N, Butterworth AS, Freitag DF, Gregson J, Willeit P, Gorman DN, Gao P, Saleheen D, Rendon A, Nelson CP, Braund PS, Hall AS, Chasman DI, Tybjaerg-Hansen A, Chambers JC, Benjamin EJ, Franks PW, Clarke R, Wilde AA, Trip MD, Steri M, Witteman JC, Qi L, van der Schoot CE, de Faire U, Erdmann J, Stringham HM, Koenig W, Rader DJ, Melzer D, Reich D, Psaty BM, Kleber ME, Panagiotakos DB, Willeit J, Wennberg P, Woodward M, Adamovic S, Rimm EB, Meade TW, Gillum RF, Shaffer JA, Hofman A, Onat A, Sundstrom J, Wassertheil-Smoller S, Mellstrom D, Gallacher J, Cushman M, Tracy RP, Kauhanen J, Karlsson M, Salonen JT, Wilhelmsen L, Amouyel P, Cantin B, Best LG, Ben-Shlomo Y, Manson JE, Davey-Smith G, de Bakker PI, O'Donnell CJ, Wilson JF, Wilson AG, Assimes TL, Jansson JO, Ohlsson C, Tivesten A, Ljunggren O, Reilly MP, Hamsten A, Ingelsson E, Cambien F, Hung J, Thomas GN, Boehnke M, Schunkert H, Asselbergs FW, Kastelein JJ, Gudnason V, Salomaa V, Harris TB, Kooner JS, Allin KH, Nordestgaard BG, Hopewell JC, Goodall AH, Ridker PM, Holm H, Watkins H, Ouwehand WH, Samani NJ, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Harari O, Danesh J: Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: A collaborative meta-analysis of 82 studies. *Lancet* 2012;379:1205-1213.
- Collard CD, Gelman S: Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133-1138.
- Confalonieri M, Urbino R, Potena A, Piattella M, Parigi P, Puccio G, Della Porta R, Giorgio C, Blasi F, Umberger R, Meduri GU: Hydrocortisone infusion for severe community-acquired pneumonia: A preliminary randomized study. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005;171:242-248.
- Cooper CJ, Landzberg MJ, Anderson TJ, Charbonneau F, Creager MA, Ganz P, Selwyn AP: Role of nitric oxide in the local regulation of pulmonary vascular resistance in humans. *Circulation* 1996;93:266-271.
- Craig TR, Duffy MJ, Shyamsundar M, McDowell C, O'Kane CM, Elborn JS, McAuley DF: A randomized clinical trial of hydroxymethylglutaryl- coenzyme a reductase inhibition for acute lung injury (the harp study). *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011;183:620-626.
- Cross LJ, Matthay MA: Biomarkers in acute lung injury: Insights into the pathogenesis of acute lung injury. *Critical care clinics* 2011;27:355-377.
- Curley GF, Hayes M, Ansari B, Shaw G, Ryan A, Barry F, O'Brien T, O'Toole D, Laffey JG: Mesenchymal stem cells enhance recovery and repair following ventilator-induced lung injury in the rat. *Thorax* 2012;67:496-501.
- Cuschieri J, Bulger E, Billgrin J, Garcia I, Maier RV: Acid sphingomyelinase is required for lipid raft tlr4 complex formation. *Surg Infect (Larchmt)* 2007;8:91-106.
- Cuschieri J, Umanskiy K, Solomkin J: Pkc-zeta is essential for endotoxin-induced macrophage activation. *The Journal of surgical research* 2004;121:76-83.
- Cyster JG, Schwab SR: Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annual review of immunology* 2012;30:69-94.
- D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, Mock JR, Eto Y, Garibaldi BT, Files DC, Avalos CR, Rodriguez JV, Waickman AT, Reddy SP, Pearse DB, Sidhaye VK,

- Hassoun PM, Crow MT, King LS: Resolution of experimental lung injury by monocyte-derived inducible nitric oxide synthase. *Journal of immunology* 2012;189:2234-2245.
- Dahlem P, van Aalderen WM, de Neef M, Dijkgraaf MG, Bos AP: Randomized controlled trial of aerosolized prostacyclin therapy in children with acute lung injury. *Critical care medicine* 2004;32:1055-1060.
- Dantzker DR, Brook CJ, Dehart P, Lynch JP, Weg JG: Ventilation-perfusion distributions in the adult respiratory distress syndrome. *The American review of respiratory disease* 1979;120:1039-1052.
- Das DV, Cook HW, Spence MW: Evidence that neutral sphingomyelinase of cultured murine neuroblastoma cells is oriented externally on the plasma membrane. *Biochimica et biophysica acta* 1984;777:339-342.
- Davey-Quinn A, Gedney JA, Whiteley SM, Bellamy MC: Extravascular lung water and acute respiratory distress syndrome--oxygenation and outcome. *Anaesthesia and intensive care* 1999;27:357-362.
- Davies MJ: Crystalloid or colloid: Does it matter? *Journal of clinical anesthesia* 1989;1:464-471.
- Davis JW, Kaups KL, Parks SN: Base deficit is superior to ph in evaluating clearance of acidosis after traumatic shock. *The Journal of trauma* 1998;44:114-118.
- Day B, Friedman SM: Red cell sodium and potassium in hemorrhagic shock measured by lithium substitution analysis. *The Journal of trauma* 1980;20:52-54.
- De Nadai C, Sestili P, Cantoni O, Lievremont JP, Sciorati C, Barsacchi R, Moncada S, Meldolesi J, Clementi E: Nitric oxide inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by reducing the generation of ceramide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:5480-5485.
- Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A: Cathepsin d protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, fas/apo-1 and tnfr-alpha. *The EMBO journal* 1996;15:3861-3870.
- Delogu G, Famularo G, Amati F, Signore L, Antonucci A, Trinchieri V, Di Marzio L, Cifone MG: Ceramide concentrations in septic patients: A possible marker of multiple organ dysfunction syndrome. *Critical care medicine* 1999;27:2413-2417.
- Delpy E, Coste H, Gouville AC: Effects of cyclic gmp elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic amp and relaxation in rat aortic smooth muscle: Role of phosphodiesterase 3. *British journal of pharmacology* 1996;119:471-478.
- Dempsey Y, Morecroft I, Welsh DJ, MacRitchie NA, Herold N, Loughlin L, Nilsen M, Peacock AJ, Harmar A, Bader M, MacLean MR: Converging evidence in support of the serotonin hypothesis of dexfenfluramine-induced pulmonary hypertension with novel transgenic mice. *Circulation* 2008;117:2928-2937.
- Determann RM, Millo JL, Waddy S, Lutter R, Garrard CS, Schultz MJ: Plasma cc16 levels are associated with development of ali/ards in patients with ventilator-associated pneumonia: A retrospective observational study. *BMC pulmonary medicine* 2009;9:49.
- Dhaliwal K, Scholefield E, Ferenbach D, Gibbons M, Duffin R, Dorward DA, Morris AC, Humphries D, MacKinnon A, Wilkinson TS, Wallace WA, van Rooijen N, Mack M, Rossi AG, Davidson DJ, Hirani N, Hughes J, Haslett C, Simpson AJ: Monocytes control second-phase neutrophil emigration in established lipopolysaccharide-induced murine lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2012;186:514-524.
- Dinh-Xuan AT: Endothelial modulation of pulmonary vascular tone. *The European respiratory journal* 1992;5:757-762.
- Doehner W, Bunck AC, Rauchhaus M, von Haehling S, Brunkhorst FM, Ciccoira M, Tschope C, Ponikowski P, Claus RA, Anker SD: Secretory sphingomyelinase is upregulated in chronic heart failure: A second messenger system of



- immune activation relates to body composition, muscular functional capacity, and peripheral blood flow. *European heart journal* 2007;28:821-828.
- Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, Walz A, Robertson CR, Carter DC, Grant IS, Pollok AJ, Haslett C: Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* 1993;341:643-647.
- Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, Mackenzie A, Haslett C: The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Annals of internal medicine* 1996;125:191-196.
- Dos Santos CC, Slutsky AS: Invited review: Mechanisms of ventilator-induced lung injury: A perspective. *Journal of applied physiology* 2000;89:1645-1655.
- Doucet DR, Bonitz RP, Feinman R, Colorado I, Ramanathan M, Feketeova E, Condon M, Machiedo GW, Hauser CJ, Xu DZ, Deitch EA: Estrogenic hormone modulation abrogates changes in red blood cell deformability and neutrophil activation in trauma hemorrhagic shock. *The Journal of trauma* 2010;68:35-41.
- Dreschers S, Franz P, Dumitru C, Wilker B, Jahnke K, Gulbins E: Infections with human rhinovirus induce the formation of distinct functional membrane domains. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2007;20:241-254.
- Dreyfuss D, Basset G, Soler P, Saumon G: Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats. *The American review of respiratory disease* 1985;132:880-884.
- Dreyfuss D, Saumon G: Ventilator-induced lung injury: Lessons from experimental studies. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998;157:294-323.
- Drobnik W, Liebisch G, Audebert FX, Frohlich D, Gluck T, Vogel P, Rothe G, Schmitz G: Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients. *Journal of lipid research* 2003;44:754-761.
- Druml W, Steltzer H, Waldhausl W, Lenz K, Hammerle A, Vierhapper H, Gasic S, Wagner OF: Endothelin-1 in adult respiratory distress syndrome. *The American review of respiratory disease* 1993;148:1169-1173.
- Dubick MA, Wade CE: A review of the efficacy and safety of 7.5% nacl/6% dextran 70 in experimental animals and in humans. *The Journal of trauma* 1994;36:323-330.
- Dudek SM, Camp SM, Chiang ET, Singleton PA, Usatyuk PV, Zhao Y, Natarajan V, Garcia JG: Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by fty720 does not require the s1p1 receptor. *Cellular signalling* 2007;19:1754-1764.
- Dudek SM, Garcia JG: Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *Journal of applied physiology* 2001;91:1487-1500.
- Dudek SM, Garcia JG: Rho family of guanine exchange factors (gefs) in cellular activation: Who's dancing? And with whom? *Circulation research* 2003;93:794-795.
- Dumitru CA, Gulbins E: Trail activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene* 2006;25:5612-5625.
- Edelmann B, Bertsch U, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Perrotta C, Jakob M, Adam-Klages S, Kabelitz D, Schutze S: Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in tnfr1 receptosomes. *The EMBO journal* 2011;30:379-394.
- Egi M, Kim I, Nichol A, Stachowski E, French CJ, Hart GK, Hegarty C, Bailey M, Bellomo R: Ionized calcium concentration and outcome in critical illness. *Critical care medicine* 2011;39:314-321.

- Eisner MD, Parsons P, Matthay MA, Ware L, Greene K, Acute Respiratory Distress Syndrome N: Plasma surfactant protein levels and clinical outcomes in patients with acute lung injury. *Thorax* 2003;58:983-988.
- Eisner MD, Thompson T, Hudson LD, Luce JM, Hayden D, Schoenfeld D, Matthay MA, Acute Respiratory Distress Syndrome N: Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;164:231-236.
- Eklund L, Saharinen P: Angiopoietin signaling in the vasculature. *Experimental cell research* 2013;319:1271-1280.
- Eldridge L, Moldobaeva A, Wagner EM: Increased hyaluronan fragmentation during pulmonary ischemia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;301:L782-788.
- Erickson SE, Martin GS, Davis JL, Matthay MA, Eisner MD, Network NNA: Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005. *Critical care medicine* 2009;37:1574-1579.
- Esen M, Schreiner B, Jendrossek V, Lang F, Fassbender K, Grassme H, Gulbins E: Mechanisms of staphylococcus aureus induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2001;6:431-439.
- Eser O, Kalkan E, Cosar M, Buyukbas S, Avunduk MC, Aslan A, Kocabas V: The effect of aprotinin on brain ischemic-reperfusion injury after hemorrhagic shock in rats: An experimental study. *The Journal of trauma* 2007;63:373-378.
- Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, Morris KG, Jr., Hepler LK, Sato K, LeCras TD, Abman SH, Weinberger HD, Huang PL, McMurtry IF, Rodman DM: The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous enos-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *The Journal of clinical investigation* 1999;103:291-299.
- Falk JL, O'Brien JF, Kerr R: Fluid resuscitation in traumatic hemorrhagic shock. *Critical care clinics* 1992;8:323-340.
- Fan J: Tlr cross-talk mechanism of hemorrhagic shock-primed pulmonary neutrophil infiltration. *The open critical care medicine journal* 2010;2:1-8.
- Fang X, Neyrinck AP, Matthay MA, Lee JW: Allogeneic human mesenchymal stem cells restore epithelial protein permeability in cultured human alveolar type ii cells by secretion of angiopoietin-1. *The Journal of biological chemistry* 2010;285:26211-26222.
- Ferguson ND, Fan E, Camporota L, Antonelli M, Anzueto A, Beale R, Brochard L, Brower R, Esteban A, Gattinoni L, Rhodes A, Slutsky AS, Vincent JL, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ranieri VM: The berlin definition of ards: An expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive care medicine* 2012;38:1573-1582.
- Ferlinz K, Hurwitz R, Moczall H, Lansmann S, Schuchman EH, Sandhoff K: Functional characterization of the n-glycosylation sites of human acid sphingomyelinase by site-directed mutagenesis. *European journal of biochemistry / FEBS* 1997;243:511-517.
- Ferlinz K, Hurwitz R, Vielhaber G, Suzuki K, Sandhoff K: Occurrence of two molecular forms of human acid sphingomyelinase. *The Biochemical journal* 1994;301 ( Pt 3):855-862.
- Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T: The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:3125-3128.
- Fierobe L, Brunet F, Dhainaut JF, Monchi M, Belghith M, Mira JP, Dall'ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT: Effect of inhaled nitric oxide on right ventricular function in adult respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995;151:1414-1419.

- Finfer S, Liu B, Taylor C, Bellomo R, Billot L, Cook D, Du B, McArthur C, Myburgh J, Investigators ST: Resuscitation fluid use in critically ill adults: An international cross-sectional study in 391 intensive care units. *Critical care* 2010;14:R185.
- Fischer H, Ellstrom P, Ekstrom K, Gustafsson L, Gustafsson M, Svanborg C: Ceramide as a tlr4 agonist; a putative signalling intermediate between sphingolipid receptors for microbial ligands and tlr4. *Cell Microbiol* 2007;9:1239-1251.
- Foell D, Wittkowski H, Kessel C, Luken A, Weinlage T, Varga G, Vogl T, Wirth T, Viemann D, Bjork P, van Zoelen MA, Gohar F, Srikrishna G, Kraft M, Roth J: Proinflammatory s100a12 can activate human monocytes via toll-like receptor 4. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013;187:1324-1334.
- Force ADT, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS: Acute respiratory distress syndrome: The berlin definition. *Jama* 2012;307:2526-2533.
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H: Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994;23:1121-1131.
- Forstermann U, Munzel T: Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: From marvel to menace. *Circulation* 2006;113:1708-1714.
- Fowler AA, Hamman RF, Good JT, Benson KN, Baird M, Eberle DJ, Petty TL, Hyers TM: Adult respiratory distress syndrome: Risk with common predispositions. *Annals of internal medicine* 1983;98:593-597.
- Fox TE, Houck KL, O'Neill SM, Nagarajan M, Stover TC, Pomianowski PT, Unal O, Yun JK, Naides SJ, Kester M: Ceramide recruits and activates protein kinase c zeta (pkc zeta) within structured membrane microdomains. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:12450-12457.
- Frank DU, Lowson SM, Roos CM, Rich GF: Endotoxin alters hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat lungs. *Journal of applied physiology* 1996;81:1316-1322.
- Frasch HF, Marshall C, Marshall BE: Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *The American journal of physiology* 1999;276:L304-310.
- Frazziano G, Moreno L, Moral-Sanz J, Menendez C, Escolano L, Gonzalez C, Villamor E, Alvarez-Sala JL, Cogolludo AL, Perez-Vizcaino F: Neutral sphingomyelinase, nadph oxidase and reactive oxygen species. Role in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Journal of cellular physiology* 2011;226:2633-2640.
- Fujita M, Kuwano K, Kunitake R, Hagimoto N, Miyazaki H, Kaneko Y, Kawasaki M, Maeyama T, Hara N: Endothelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *International archives of allergy and immunology* 1998;117:202-208.
- Fullerton DA, McIntyre RC, Jr., Kirson LE, St Cyr JA, Whitman GJ, Grover FL: Impact of respiratory acid-base status in patients with pulmonary hypertension. *The Annals of thoracic surgery* 1996;61:696-701.
- Futerman AH, Hannun YA: The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports* 2004;5:777-782.
- Gallagher DC, Parikh SM, Balonov K, Miller A, Gautam S, Talmor D, Sukhatme VP: Circulating angiopoietin 2 correlates with mortality in a surgical population with acute lung injury/adult respiratory distress syndrome. *Shock* 2008;29:656-661.
- Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC: Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:27237-27240.
- Garcia JG: Concepts in microvascular endothelial barrier regulation in health and disease. *Microvascular research* 2009;77:1-3.

- Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR, English D: Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *The Journal of clinical investigation* 2001;108:689-701.
- Garibaldi BT, D'Alessio FR, Mock JR, Files DC, Chau E, Eto Y, Drummond MB, Aggarwal NR, Sidhaye V, King LS: Regulatory t cells reduce acute lung injury fibroproliferation by decreasing fibrocyte recruitment. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2013;48:35-43.
- Garrean S, Gao XP, Brovkovich V, Shimizu J, Zhao YY, Vogel SM, Malik AB: Caveolin-1 regulates nf-kappab activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide. *Journal of immunology* 2006;177:4853-4860.
- Geraci MW, Gao B, Shepherd DC, Moore MD, Westcott JY, Fagan KA, Alger LA, Tudor RM, Voelkel NF: Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *The Journal of clinical investigation* 1999;103:1509-1515.
- Gerlach H, Keh D, Semmerow A, Busch T, Lewandowski K, Pappert DM, Rossaint R, Falke KJ: Dose-response characteristics during long-term inhalation of nitric oxide in patients with severe acute respiratory distress syndrome: A prospective, randomized, controlled study. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003;167:1008-1015.
- Giaid A, Saleh D: Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 1995;333:214-221.
- Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ: Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 1993;328:1732-1739.
- Girod JP, Brotman DJ: Does altered glucocorticoid homeostasis increase cardiovascular risk? *Cardiovascular research* 2004;64:217-226.
- Gluck L, Kulovich MV, Borer RC, Jr., Brenner PH, Anderson GG, Spellacy WN: Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *American journal of obstetrics and gynecology* 1971;109:440-445.
- Godin LM, Vergen J, Prakash YS, Pagano RE, Hubmayr RD: Spatiotemporal dynamics of actin remodeling and endomembrane trafficking in alveolar epithelial type i cell wound healing. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;300:L615-623.
- Goggel R, Uhlig S: The inositol trisphosphate pathway mediates platelet-activating-factor-induced pulmonary oedema. *The European respiratory journal* 2005;25:849-857.
- Goggel R, Winoto-Morbach S, Vielhaber G, Imai Y, Lindner K, Brade L, Brade H, Ehlers S, Slutsky AS, Schutze S, Gulbins E, Uhlig S: Paf-mediated pulmonary edema: A new role for acid sphingomyelinase and ceramide. *Nature medicine* 2004;10:155-160.
- Goldkorn T, Ravid T, Khan EM: Life and death decisions: Ceramide generation and egf receptor trafficking are modulated by oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 2005;7:119-128.
- Gon Y, Wood MR, Kioussis WB, Jo E, Sanna MG, Chun J, Rosen H: S1p3 receptor-induced reorganization of epithelial tight junctions compromises lung barrier integrity and is potentiated by tnfr. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:9270-9275.
- Goni FM, Alonso A: Sphingomyelinases: Enzymology and membrane activity. *FEBS letters* 2002;531:38-46.
- Goolaerts A, Lafargue M, Song Y, Miyazawa B, Arjomandi M, Carles M, Roux J, Howard M, Parks DA, Iles KE, Pittet JF: Pai-1 is an essential component of the pulmonary host response during pseudomonas aeruginosa pneumonia in mice. *Thorax* 2011;66:788-796.

- Gorska M, Baranczuk E, Dobrzyn A: Secretory zn<sup>2+</sup>-dependent sphingomyelinase activity in the serum of patients with type 2 diabetes is elevated. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2003;35:506-507.
- Goss CH, Brower RG, Hudson LD, Rubenfeld GD, Network A: Incidence of acute lung injury in the united states. *Critical care medicine* 2003;31:1607-1611.
- Gotts JE, Matthay MA: Mesenchymal stem cells and acute lung injury. *Critical care clinics* 2011;27:719-733.
- Gould SA, Sehgal LR, Sehgal HL, Moss GS: Hypovolemic shock. *Critical care clinics* 1993;9:239-259.
- Gow AJ, Thom SR, Ischiropoulos H: Nitric oxide and peroxynitrite-mediated pulmonary cell death. *The American journal of physiology* 1998;274:L112-118.
- Grassme H, Gulbins E, Brenner B, Ferlinz K, Sandhoff K, Harzer K, Lang F, Meyer TF: Acidic sphingomyelinase mediates entry of n. Gonorrhoeae into nonphagocytic cells. *Cell* 1997;91:605-615.
- Grassme H, Jekle A, Riehle A, Schwarz H, Berger J, Sandhoff K, Kolesnick R, Gulbins E: Cd95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:20589-20596.
- Grassme H, Jendrossek V, Bock J, Riehle A, Gulbins E: Ceramide-rich membrane rafts mediate cd40 clustering. *Journal of immunology* 2002;168:298-307.
- Grassme H, Jendrossek V, Riehle A, von Kurthy G, Berger J, Schwarz H, Weller M, Kolesnick R, Gulbins E: Host defense against pseudomonas aeruginosa requires ceramide-rich membrane rafts. *Nature medicine* 2003;9:322-330.
- Green JA, Suzuki K, Cho B, Willison LD, Palmer D, Allen CD, Schmidt TH, Xu Y, Proia RL, Coughlin SR, Cyster JG: The sphingosine 1-phosphate receptor s1p(2) maintains the homeostasis of germinal center b cells and promotes niche confinement. *Nature immunology* 2011;12:672-680.
- Griffiths MJ, Curzen NP, Mitchell JA, Evans TW: In vivo treatment with endotoxin increases rat pulmonary vascular contractility despite nos induction. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997;156:654-658.
- Griffiths MJ, Evans TW: Inhaled nitric oxide therapy in adults. *The New England journal of medicine* 2005;353:2683-2695.
- Grommes J, Alard JE, Drechsler M, Wantha S, Morgelin M, Kuebler WM, Jacobs M, von Hundelshausen P, Markart P, Wygrecka M, Preissner KT, Hackeng TM, Koenen RR, Weber C, Soehnlein O: Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2012;185:628-636.
- Grullich C, Sullards MC, Fuks Z, Merrill AH, Jr., Kolesnick R: Cd95(fas/apo-1) signals ceramide generation independent of the effector stage of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:8650-8656.
- Guerin C, Reignier J, Richard JC, Beuret P, Gacouin A, Boulain T, Mercier E, Badet M, Mercat A, Baudin O, Clavel M, Chatellier D, Jaber S, Rosselli S, Mancebo J, Sirodot M, Hilbert G, Bengler C, Richecoeur J, Gainnier M, Bayle F, Bourdin G, Leray V, Girard R, Baboi L, Ayzac L, Group PS: Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 2013;368:2159-2168.
- Gulbins E, Dreschers S, Wilker B, Grassme H: Ceramide, membrane rafts and infections. *Journal of molecular medicine* 2004;82:357-363.
- Gulbins E, Kolesnick R: Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* 2003;22:7070-7077.
- Gulbins E, Li PL: Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2006;290:R11-26.

- Guo WA, Knight PR, Raghavendran K: The receptor for advanced glycation end products and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Intensive care medicine* 2012;38:1588-1598.
- Gupta N, Krasnodembskaya A, Kapetanaki M, Mouded M, Tan X, Serikov V, Matthay MA: Mesenchymal stem cells enhance survival and bacterial clearance in murine escherichia coli pneumonia. *Thorax* 2012;67:533-539.
- Gutierrez G, Reines HD, Wulf-Gutierrez ME: Clinical review: Hemorrhagic shock. *Critical care* 2004;8:373-381.
- Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Bayoumy S, Garzotto M, McLoughlin M, Gallily R, Edwards CK, 3rd, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R: Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *The Journal of experimental medicine* 1997;186:1831-1841.
- Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S: Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochimica et biophysica acta* 2006;1758:2016-2026.
- Halvorsen L, Gunther RA, Dubick MA, Holcroft JW: Dose response characteristics of hypertonic saline dextran solutions. *The Journal of trauma* 1991;31:785-793; discussion 793-784.
- Hanada K: Sphingolipids in infectious diseases. *Japanese journal of infectious diseases* 2005;58:131-148.
- Hannon JP, Wade CE, Bossone CA, Hunt MM, Coppes RI, Loveday JA: Blood gas and acid-base status of conscious pigs subjected to fixed-volume hemorrhage and resuscitated with hypertonic saline dextran. *Circulatory shock* 1990;32:19-29.
- Hannun YA, Obeid LM: The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: Stress encounters of the lipid kind. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:25847-25850.
- Harikumar KB, Yester JW, Surace MJ, Oyeniran C, Price MM, Huang WC, Hait NC, Allegood JC, Yamada A, Kong X, Lazear HM, Bhardwaj R, Takabe K, Diamond MS, Luo C, Milstien S, Spiegel S, Kordula T: K63-linked polyubiquitination of transcription factor irf1 is essential for il-1-induced production of chemokines cxcl10 and ccl5. *Nature immunology* 2014;15:231-238.
- Heinrich M, Wickel M, Schneider-Brachert W, Sandberg C, Gahr J, Schwandner R, Weber T, Saftig P, Peters C, Brunner J, Kronke M, Schutze S: Cathepsin d targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide. *The EMBO journal* 1999;18:5252-5263.
- Henry B, Ziobro R, Becker KA, Kolesnick R, Gulbins E: Acid sphingomyelinase. *Handbook of experimental pharmacology* 2013:77-88.
- Hergrueter AH, Nguyen K, Owen CA: Matrix metalloproteinases: All the rage in the acute respiratory distress syndrome. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;300:L512-515.
- Hernandez OM, Discher DJ, Bishopric NH, Webster KA: Rapid activation of neutral sphingomyelinase by hypoxia-reoxygenation of cardiac myocytes. *Circulation research* 2000;86:198-204.
- Herold S, Mayer K, Lohmeyer J: Acute lung injury: How macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. *Frontiers in immunology* 2011a;2:65.
- Herold S, Tabar TS, Janssen H, Hoegner K, Cabanski M, Lewe-Schlosser P, Albrecht J, Driever F, Vadasz I, Seeger W, Steinmueller M, Lohmeyer J: Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of il-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011b;183:1380-1390.
- Herold S, von Wulffen W, Steinmueller M, Pleschka S, Kuziel WA, Mack M, Srivastava M, Seeger W, Maus UA, Lohmeyer J: Alveolar epithelial cells direct monocyte transepithelial migration upon influenza virus infection:

- Impact of chemokines and adhesion molecules. *Journal of immunology* 2006;177:1817-1824.
- Hetz CA, Hunn M, Rojas P, Torres V, Leyton L, Quest AF: Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the fas receptor in lymphoid cells: Onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *Journal of cell science* 2002;115:4671-4683.
- Hidalgo A, Chang J, Jang JE, Peired AJ, Chiang EY, Frenette PS: Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury. *Nature medicine* 2009;15:384-391.
- Hierholzer C, Billiar TR: Molecular mechanisms in the early phase of hemorrhagic shock. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* 2001;386:302-308.
- Hogner K, Wolff T, Pleschka S, Plog S, Gruber AD, Kalinke U, Walmrath HD, Bodner J, Gattenlohner S, Lewe-Schlösser P, Matrosovich M, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S: Macrophage-expressed ifn-beta contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia. *PLoS pathogens* 2013;9:e1003188.
- Hollenstein U, Homoncik M, Stohlawetz PJ, Marsik C, Sieder A, Eichler HG, Jilma B: Endotoxin down-modulates granulocyte colony-stimulating factor receptor (cd114) on human neutrophils. *The Journal of infectious diseases* 2000;182:343-346.
- Hosakote YM, Komaravelli N, Mautemps N, Liu T, Garofalo RP, Casola A: Antioxidant mimetics modulate oxidative stress and cellular signaling in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;303:L991-1000.
- Hoshikawa Y, Voelkel NF, Gesell TL, Moore MD, Morris KG, Alger LA, Narumiya S, Geraci MW: Prostacyclin receptor-dependent modulation of pulmonary vascular remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;164:314-318.
- Hsu YW, Chi KH, Huang WC, Lin WW: Ceramide inhibits lipopolysaccharide-mediated nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction in macrophages: Effects on protein kinases and transcription factors. *Journal of immunology* 2001;166:5388-5397.
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC: Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995;377:239-242.
- Hudson LD, Milberg JA, Anardi D, Maunder RJ: Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995;151:293-301.
- Hudson LD, Steinberg KP: Epidemiology of acute lung injury and ards. *Chest* 1999;116:74S-82S.
- Huh JW, Koh Y: Ventilation parameters used to guide cardiopulmonary function during mechanical ventilation. *Current opinion in critical care* 2013;19:215-220.
- Humphrey H, Hall J, Sznajder I, Silverstein M, Wood L: Improved survival in ards patients associated with a reduction in pulmonary capillary wedge pressure. *Chest* 1990;97:1176-1180.
- Hung MJ, Cherg WJ, Hung MY, Wu HT, Pang JH: Interleukin-6 inhibits endothelial nitric oxide synthase activation and increases endothelial nitric oxide synthase binding to stabilized caveolin-1 in human vascular endothelial cells. *Journal of hypertension* 2010;28:940-951.
- Hurwitz R, Ferlinz K, Sandhoff K: The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 1994a;375:447-450.

- Hurwitz R, Ferlinz K, Vielhaber G, Moczał H, Sandhoff K: Processing of human acid sphingomyelinase in normal and i-cell fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 1994b;269:5440-5445.
- Husmann B, Taeger G, Lefering R, Waydhas C, Nast-Kolb D, Ruchholtz S, Lendemans S, TraumaRegister der Deutschen Gesellschaft für U: [lethality and outcome in multiple injured patients after severe abdominal and pelvic trauma. Influence of preclinical volume replacement - an analysis of 604 patients from the trauma registry of the dgu]. *Der Unfallchirurg* 2011;114:705-712.
- Huttemeier PC, Watkins WD, Peterson MB, Zapol WM: Acute pulmonary hypertension and lung thromboxane release after endotoxin infusion in normal and leukopenic sheep. *Circulation research* 1982;50:688-694.
- Huwyler A, Johansen B, Skarstad A, Pfeilschifter J: Ceramide binds to the calb domain of cytosolic phospholipase a2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2001;15:7-9.
- Ichikawa S, Hirabayashi Y: Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends in cell biology* 1998;8:198-202.
- Ichinose F, Hataishi R, Wu JC, Kawai N, Rodrigues AC, Mallari C, Post JM, Parkinson JF, Picard MH, Bloch KD, Zapol WM: A selective inducible nos dimerization inhibitor prevents systemic, cardiac, and pulmonary hemodynamic dysfunction in endotoxemic mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2003;285:H2524-2530.
- Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Müller T, Soullie T, Willart MA, Hijdra D, Hoogsteden HC, Lambrecht BN: Local application of fty720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function. *The Journal of clinical investigation* 2006;116:2935-2944.
- Igarashi J, Thatte HS, Prabhakar P, Golan DE, Michel T: Calcium-independent activation of endothelial nitric oxide synthase by ceramide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:12583-12588.
- Ionescu L, Byrne RN, van Haaften T, Vadivel A, Alphonse RS, Rey-Parra GJ, Weissmann G, Hall A, Eaton F, Thebaud B: Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: In vivo evidence for stem cell paracrine action. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;303:L967-977.
- Ishizaka A, Matsuda T, Albertine KH, Koh H, Tasaka S, Hasegawa N, Kohno N, Kotani T, Morisaki H, Takeda J, Nakamura M, Fang X, Martin TR, Matthay MA, Hashimoto S: Elevation of kl-6, a lung epithelial cell marker, in plasma and epithelial lining fluid in acute respiratory distress syndrome. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004;286:L1088-1094.
- Islam MN, Das SR, Emin MT, Wei M, Sun L, Westphalen K, Rowlands DJ, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J: Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nature medicine* 2012;18:759-765.
- Ito T, Ikeda U, Shimpo M, Yamamoto K, Shimada K: Serotonin increases interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2000;102:2522-2527.
- Jabaudon M, Futier E, Roszyk L, Chalus E, Guerin R, Petit A, Mrozek S, Perbet S, Cayot-Constantin S, Chartier C, Sapin V, Bazin JE, Constantin JM: Soluble form of the receptor for advanced glycation end products is a marker of acute lung injury but not of severe sepsis in critically ill patients. *Critical care medicine* 2011;39:480-488.
- Janssen WJ, Barthel L, Muldrow A, Oberley-Deegan RE, Kearns MT, Jakubzick C, Henson PM: Fas determines differential fates of resident and recruited



- macrophages during resolution of acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011;184:547-560.
- Jenkins RW, Canals D, Hannun YA: Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cellular signalling* 2009;21:836-846.
- Jenne CN, Urrutia R, Kubes P: Platelets: Bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *International journal of laboratory hematology* 2013;35:254-261.
- Jiang D, Liang J, Noble PW: Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiological reviews* 2011;91:221-264.
- Jin Y, Lee SJ, Minshall RD, Choi AM: Caveolin-1: A critical regulator of lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;300:L151-160.
- Johnson KR, Johnson KY, Becker KP, Bielawski J, Mao C, Obeid LM: Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:34541-34547.
- Johnston CJ, Rubenfeld GD, Hudson LD: Effect of age on the development of ards in trauma patients. *Chest* 2003;124:653-659.
- Joyner BL, Jones SW, Cairns BA, Harris BD, Coverstone AM, Abode KA, Ortiz-Pujols SM, Kocis KC, Noah TL: DNA and inflammatory mediators in bronchoalveolar lavage fluid from children with acute inhalational injuries. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* 2013;34:326-333.
- Kaplan LJ, Kellum JA: Initial ph, base deficit, lactate, anion gap, strong ion difference, and strong ion gap predict outcome from major vascular injury. *Critical care medicine* 2004;32:1120-1124.
- Katayama M, Ishizaka A, Sakamoto M, Fujishima S, Sekiguchi K, Asano K, Betsuyaku T, Kotani T, Ware LB, Matthay MA, Hashimoto S: Laminin gamma2 fragments are increased in the circulation of patients with early phase acute lung injury. *Intensive care medicine* 2010;36:479-486.
- Kawano T, Mori S, Cybulsky M, Burger R, Ballin A, Cutz E, Bryan AC: Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *Journal of applied physiology* 1987;62:27-33.
- Kelly NM, Young L, Cross AS: Differential induction of tumor necrosis factor by bacteria expressing rough and smooth lipopolysaccharide phenotypes. *Infection and immunity* 1991;59:4491-4496.
- Kerger H, Saltzman DJ, Menger MD, Messmer K, Intaglietta M: Systemic and subcutaneous microvascular po2 dissociation during 4-h hemorrhagic shock in conscious hamsters. *The American journal of physiology* 1996;270:H827-836.
- Kim JY, Park JS, Strassheim D, Douglas I, Diaz del Valle F, Asehnoune K, Mitra S, Kwak SH, Yamada S, Maruyama I, Ishizaka A, Abraham E: Hmgb1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2005;288:L958-965.
- Kinross JM, Alkhamesi N, Barton RH, Silk DB, Yap IK, Darzi AW, Holmes E, Nicholson JK: Global metabolic phenotyping in an experimental laparotomy model of surgical trauma. *Journal of proteome research* 2011;10:277-287.
- Koide N, Sugiyama T, Mori I, Mu MM, Yoshida T, Yokochi T: C2-ceramide inhibits lps-induced nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cells through down-regulating the activation of akt. *Journal of endotoxin research* 2003;9:85-90.
- Kolesnick RN: 1,2-diacylglycerols but not phorbol esters stimulate sphingomyelin hydrolysis in gh3 pituitary cells. *The Journal of biological chemistry* 1987;262:16759-16762.
- Kolesnick RN, Goni FM, Alonso A: Compartmentalization of ceramide signaling: Physical foundations and biological effects. *Journal of cellular physiology* 2000;184:285-300.

- Kolter T, Sandhoff K: Principles of lysosomal membrane digestion: Stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annual review of cell and developmental biology* 2005;21:81-103.
- Kolzer M, Arenz C, Ferlinz K, Werth N, Schulze H, Klingenstein R, Sandhoff K: Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate is a potent and selective inhibitor of acid sphingomyelinase. *Biological chemistry* 2003;384:1293-1298.
- Kor DJ, Iscimen R, Yilmaz M, Brown MJ, Brown DR, Gajic O: Statin administration did not influence the progression of lung injury or associated organ failures in a cohort of patients with acute lung injury. *Intensive care medicine* 2009;35:1039-1046.
- Koval M: Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions. *Annual review of physiology* 2013;75:551-567.
- Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW, Matthay MA: Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide IL-37. *Stem cells* 2010;28:2229-2238.
- Krishna G, Sleigh JW, Rahman H: Physiological predictors of death in exsanguinating trauma patients undergoing conventional trauma surgery. *The Australian and New Zealand journal of surgery* 1998;68:826-829.
- Krut O, Wiegmann K, Kashkar H, Yazdanpanah B, Kronke M: Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a c-tail-anchored protein. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:13784-13793.
- Kubera M, Maes M, Kenis G, Kim YK, Lason W: Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Psychiatry research* 2005;134:251-258.
- Kuo C, Chen J: Effect of meconium aspiration on plasma endothelin-1 level and pulmonary hemodynamics in a piglet model. *Biology of the neonate* 1999;76:228-234.
- Kusuda S, Cui CY, Takahashi M, Tezuka T: Localization of sphingomyelinase in lesional skin of atopic dermatitis patients. *The Journal of investigative dermatology* 1998;111:733-738.
- Lakshmi SP, Reddy AT, Naik MU, Naik UP, Reddy RC: Effects of jam-a deficiency or blocking antibodies on neutrophil migration and lung injury in a murine model of ali. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;303:L758-766.
- Lamour NF, Wijesinghe DS, Mietla JA, Ward KE, Stahelin RV, Chalfant CE: Ceramide kinase regulates the production of tumor necrosis factor alpha (tnfalpha) via inhibition of tnfa-converting enzyme. *The Journal of biological chemistry* 2011;286:42808-42817.
- Lang PA, Kempe DS, Tanneur V, Eisele K, Klari BA, Myssina S, Jendrossek V, Ishii S, Shimizu T, Waidmann M, Hessler G, Huber SM, Lang F, Wieder T: Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *Journal of cell science* 2005;118:1233-1243.
- Langmann T, Buechler C, Ries S, Schaeffler A, Aslanidis C, Schuierer M, Weiler M, Sandhoff K, de Jong PJ, Schmitz G: Transcription factors sp1 and ap-2 mediate induction of acid sphingomyelinase during monocytic differentiation. *Journal of lipid research* 1999;40:870-880.
- Lannert H, Gorgas K, Meissner I, Wieland FT, Jeckel D: Functional organization of the golgi apparatus in glycosphingolipid biosynthesis. Lactosylceramide and subsequent glycosphingolipids are formed in the lumen of the late golgi. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:2939-2946.
- Larsen PJ, Tennagels N: On ceramides, other sphingolipids and impaired glucose homeostasis. *Molecular metabolism* 2014;3:252-260.

- Lecka-Czernik B, Moerman EJ, Jones RA, Goldstein S: Identification of gene sequences overexpressed in senescent and werner syndrome human fibroblasts. *Experimental gerontology* 1996;31:159-174.
- Lee C, Xu DZ, Feketeova E, Kannan KB, Yun JK, Deitch EA, Fekete Z, Livingston DH, Hauser CJ: Attenuation of shock-induced acute lung injury by sphingosine kinase inhibition. *The Journal of trauma* 2004;57:955-960.
- Lee C, Xu DZ, Feketeova E, Nemeth Z, Kannan KB, Hasko G, Deitch EA, Hauser CJ: Calcium entry inhibition during resuscitation from shock attenuates inflammatory lung injury. *Shock* 2008;30:29-35.
- Lee CY, Tamura T, Rabah N, Lee DY, Ruel I, Hafiane A, Iatan I, Nyholt D, Laporte F, Lazure C, Wada I, Krimbou L, Genest J: Carboxyl-terminal disulfide bond of acid sphingomyelinase is critical for its secretion and enzymatic function. *Biochemistry* 2007;46:14969-14978.
- Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T: Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 1999;99:301-312.
- Lee WL, Downey GP: Neutrophil activation and acute lung injury. *Current opinion in critical care* 2001;7:1-7.
- Leeman M: The pulmonary circulation in acute lung injury: A review of some recent advances. *Intensive care medicine* 1991;17:254-260.
- Lesur O, Langevin S, Berthiaume Y, Legare M, Skrobik Y, Bellemare JF, Levy B, Fortier Y, Lauzier F, Bravo G, Nickmilder M, Rousseau E, Bernard A, Critical Care Research Group of the Quebec Respiratory Health N: Outcome value of clara cell protein in serum of patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive care medicine* 2006;32:1167-1174.
- Levade T, Andrieu-Abadie N, Segui B, Auge N, Chatelut M, Jaffrezou JP, Salvayre R: Sphingomyelin-degrading pathways in human cells role in cell signalling. *Chemistry and physics of lipids* 1999;102:167-178.
- Levade T, Jaffrezou JP: Signalling sphingomyelinases: Which, where, how and why? *Biochimica et biophysica acta* 1999;1438:1-17.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S: Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews Immunology* 2007;7:678-689.
- Li H, Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Oparil S, Elton TS: Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *Journal of applied physiology* 1994;77:1451-1459.
- Liang J, Jung Y, Tighe RM, Xie T, Liu N, Leonard M, Gunn MD, Jiang D, Noble PW: A macrophage subpopulation recruited by cc chemokine ligand-2 clears apoptotic cells in noninfectious lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;302:L933-940.
- Lin WC, Lin CF, Chen CL, Chen CW, Lin YS: Inhibition of neutrophil apoptosis via sphingolipid signaling in acute lung injury. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2011;339:45-53.
- Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL: Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic gmp-dependent protein kinase. *Hypertension* 1994;23:1141-1147.
- Lindner K, Uhlig U, Uhlig S: Ceramide alters endothelial cell permeability by a nonapoptotic mechanism. *British journal of pharmacology* 2005;145:132-140.
- Linke T, Wilkening G, Lansmann S, Moczall H, Bartelsen O, Weisgerber J, Sandhoff K: Stimulation of acid sphingomyelinase activity by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *Biological chemistry* 2001;382:283-290.
- Lipke AB, Matute-Bello G, Herrero R, Wong VA, Mongovin SM, Martin TR: Death receptors mediate the adverse effects of febrile-range hyperthermia on the outcome of lipopolysaccharide-induced lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;301:L60-70.

- Liu B, Hannun YA: Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:16281-16287.
- Liu B, Hassler DF, Smith GK, Weaver K, Hannun YA: Purification and characterization of a membrane bound neutral pH optimum magnesium-dependent and phosphatidylserine-stimulated sphingomyelinase from rat brain. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:34472-34479.
- Liu P, Anderson RG: Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *The Journal of biological chemistry* 1995;270:27179-27185.
- Liu SF, Crawley DE, Barnes PJ, Evans TW: Endothelium-derived relaxing factor inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *The American review of respiratory disease* 1991;143:32-37.
- Liu SF, Dewar A, Crawley DE, Barnes PJ, Evans TW: Effect of tumor necrosis factor on hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Journal of applied physiology* 1992;72:1044-1049.
- Lomas-Niera JL, Perl M, Chung CS, Ayala A: Shock and hemorrhage: An overview of animal models. *Shock* 2005;24 Suppl 1:33-39.
- Losa D, Chanson M, Crespín S: Connexins as therapeutic targets in lung disease. *Expert opinion on therapeutic targets* 2011;15:989-1002.
- Lotze MT, Tracey KJ: High-mobility group box 1 protein (hmgb1): Nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature reviews Immunology* 2005;5:331-342.
- Lozano J, Morales A, Cremesti A, Fuks Z, Tilly JL, Schuchman E, Gulbins E, Kolesnick R: Niemann-pick disease versus acid sphingomyelinase deficiency. *Cell death and differentiation* 2001;8:100-103.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasser K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA, 3rd, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De Leon FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA: Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic

- analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet* 2012;380:2095-2128.
- Lucas CE: Update on trauma care in canada. 4. Resuscitation through the three phases of hemorrhagic shock after trauma. *Canadian journal of surgery Journal canadien de chirurgie* 1990;33:451-456.
- Ma Y, Pitson S, Hercus T, Murphy J, Lopez A, Woodcock J: Sphingosine activates protein kinase a type ii by a novel camp-independent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:26011-26017.
- Machleidt T, Kramer B, Adam D, Neumann B, Schutze S, Wiegmann K, Kronke M: Function of the p55 tumor necrosis factor receptor "death domain" mediated by phosphatidylcholine-specific phospholipase c. *The Journal of experimental medicine* 1996;184:725-733.
- MacKichan ML, DeFranco AL: Role of ceramide in lipopolysaccharide (lps)-induced signaling. Lps increases ceramide rather than acting as a structural homolog. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:1767-1775.
- Maille E, Trinh NT, Prive A, Bilodeau C, Bissonnette E, Grandvaux N, Brochiero E: Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by tnfr-alpha after injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;301:L945-955.
- Malur A, Baker AD, McCoy AJ, Wells G, Barna BP, Kavuru MS, Malur AG, Thomassen MJ: Restoration of ppargamma reverses lipid accumulation in alveolar macrophages of gm-csf knockout mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;300:L73-80.
- Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H: Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 2002;296:346-349.
- Mandon EC, Ehses I, Rother J, van Echten G, Sandhoff K: Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine n-acyltransferase in mouse liver. *The Journal of biological chemistry* 1992;267:11144-11148.
- Maniatis NA, Brovkovich V, Allen SE, John TA, Shajahan AN, Tirupathi C, Vogel SM, Skidgel RA, Malik AB, Minshall RD: Novel mechanism of endothelial nitric oxide synthase activation mediated by caveolae internalization in endothelial cells. *Circulation research* 2006;99:870-877.
- Maniatis NA, Orfanos SE: The endothelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Current opinion in critical care* 2008;14:22-30.
- Mao C, Obeid LM: Ceramidases: Regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et biophysica acta* 2008;1781:424-434.
- Marathe S, Schissel SL, Yellin MJ, Beatini N, Mintzer R, Williams KJ, Tabas I: Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:4081-4088.
- Marchesini N, Hannun YA: Acid and neutral sphingomyelinases: Roles and mechanisms of regulation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 2004;82:27-44.
- Marik PE: Sublingual capnometry: A non-invasive measure of microcirculatory dysfunction and tissue hypoxia. *Physiological measurement* 2006;27:R37-47.
- Marletta MA: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The Journal of biological chemistry* 1993;268:12231-12234.
- Marshall BE, Hanson CW, Frasci F, Marshall C: Role of hypoxic pulmonary vasoconstriction in pulmonary gas exchange and blood flow distribution. 2. *Pathophysiology. Intensive care medicine* 1994;20:379-389.

- Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE: Pulmonary artery nadph-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1996;15:633-644.
- Marshall RP, Bellingan G, Webb S, Puddicombe A, Goldsack N, McAnulty RJ, Laurent GJ: Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000;162:1783-1788.
- Martin TR, Mathison JC, Tobias PS, Leturcq DJ, Moriarty AM, Maunder RJ, Ulevitch RJ: Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs. *The Journal of clinical investigation* 1992;90:2209-2219.
- Marzi I: Hemorrhagic shock: Update in pathophysiology and therapy. *Acta anaesthesiologica Scandinavica Supplementum* 1997;111:42-44.
- Mason NA, Springall DR, Burke M, Pollock J, Mikhail G, Yacoub MH, Polak JM: High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *The Journal of pathology* 1998;185:313-318.
- Mathias S, Younes A, Kan CC, Orlow I, Joseph C, Kolesnick RN: Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact el4 cells and in a cell-free system by il-1 beta. *Science* 1993;259:519-522.
- Matsumoto A, Comatas KE, Liu L, Stamler JS: Screening for nitric oxide-dependent protein-protein interactions. *Science* 2003;301:657-661.
- Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C: Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiological reviews* 2002;82:569-600.
- Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA: The acute respiratory distress syndrome. *The Journal of clinical investigation* 2012;122:2731-2740.
- Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR: Animal models of acute lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2008;295:L379-399.
- Matute-Bello G, Liles WC, Radella F, 2nd, Steinberg KP, Ruzinski JT, Hudson LD, Martin TR: Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine* 2000;28:1-7.
- Mauri T, Masson S, Pradella A, Bellani G, Coppadoro A, Bombino M, Valentino S, Patroniti N, Mantovani A, Pesenti A, Latini R: Elevated plasma and alveolar levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts are associated with severity of lung dysfunction in ards patients. *The Tohoku journal of experimental medicine* 2010;222:105-112.
- McClintock DE, Starcher B, Eisner MD, Thompson BT, Hayden DL, Church GD, Matthay MA, National Heart LBIARDSCNTN: Higher urine desmosine levels are associated with mortality in patients with acute lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2006;291:L566-571.
- McCollister BD, Myers JT, Jones-Carson J, Voelker DR, Vazquez-Torres A: Constitutive acid sphingomyelinase enhances early and late macrophage killing of salmonella enterica serovar typhimurium. *Infection and immunity* 2007;75:5346-5352.
- McEwen DP, Li Q, Jackson S, Jenkins PM, Martens JR: Caveolin regulates kv1.5 trafficking to cholesterol-rich membrane microdomains. *Molecular pharmacology* 2008;73:678-685.
- McVerry BJ, Garcia JG: Endothelial cell barrier regulation by sphingosine 1-phosphate. *Journal of cellular biochemistry* 2004;92:1075-1085.
- Medford AR, Millar AB: Vascular endothelial growth factor (vegf) in acute lung injury (ali) and acute respiratory distress syndrome (ards): Paradox or paradigm? *Thorax* 2006;61:621-626.
- Meduri GU: Late adult respiratory distress syndrome. *New horizons* 1993;1:563-577.

- Meduri GU, Belenchia JM, Estes RJ, Wunderink RG, el Torky M, Leeper KV, Jr.: Fibroproliferative phase of ards. Clinical findings and effects of corticosteroids. *Chest* 1991;100:943-952.
- Meduri GU, Golden E, Freire AX, Taylor E, Zaman M, Carson SJ, Gibson M, Umberger R: Methylprednisolone infusion in early severe ards: Results of a randomized controlled trial. *Chest* 2007;131:954-963.
- Meduri GU, Headley AS, Golden E, Carson SJ, Umberger RA, Kelso T, Tolley EA: Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: A randomized controlled trial. *Jama* 1998;280:159-165.
- Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R, Leeper K: Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ards. Plasma il-1 beta and il-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest* 1995;107:1062-1073.
- Meduri GU, Tolley EA, Chrousos GP, Stentz F: Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with unresolving acute respiratory distress syndrome: Evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucocorticoids. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002;165:983-991.
- Mehta D, Malik AB: Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological reviews* 2006;86:279-367.
- Mekontso Dessap A, Charron C, Devaquet J, Aboab J, Jardin F, Brochard L, Vieillard-Baron A: Impact of acute hypercapnia and augmented positive end-expiratory pressure on right ventricle function in severe acute respiratory distress syndrome. *Intensive care medicine* 2009;35:1850-1858.
- Menendez C, Martinez-Caro L, Moreno L, Nin N, Moral-Sanz J, Morales D, Cogolludo A, Esteban A, Lorente JA, Perez-Vizcaino F: Pulmonary vascular dysfunction induced by high tidal volume mechanical ventilation. *Critical care medicine* 2013;41:e149-155.
- Messerole E, Peine P, Wittkopp S, Marini JJ, Albert RK: The pragmatics of prone positioning. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002;165:1359-1363.
- Michel C, van Echten-Deckert G: Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. *FEBS letters* 1997;416:153-155.
- Michel C, van Echten-Deckert G, Rother J, Sandhoff K, Wang E, Merrill AH, Jr.: Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *The Journal of biological chemistry* 1997a;272:22432-22437.
- Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T: Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 1997b;272:25907-25912.
- Michelakis ED, Thebaud B, Weir EK, Archer SL: Hypoxic pulmonary vasoconstriction: Redox regulation of o<sub>2</sub>-sensitive k<sup>+</sup> channels by a mitochondrial o<sub>2</sub>-sensor in resistance artery smooth muscle cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2004;37:1119-1136.
- Mihai C, Bao S, Lai JP, Ghadiali SN, Knoell DL: Pten inhibition improves wound healing in lung epithelia through changes in cellular mechanics that enhance migration. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;302:L287-299.
- Milberg JA, Davis DR, Steinberg KP, Hudson LD: Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ards): 1983-1993. *Jama* 1995;273:306-309.

- Mir-Kasimov M, Sturrock A, McManus M, Paine R, 3rd: Effect of alveolar epithelial cell plasticity on the regulation of gm-csf expression. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;302:L504-511.
- Mitchell LA, Overgaard CE, Ward C, Margulies SS, Koval M: Differential effects of claudin-3 and claudin-4 on alveolar epithelial barrier function. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;301:L40-49.
- Mitra P, Maceyka M, Payne SG, Lamour N, Milstien S, Chalfant CE, Spiegel S: Ceramide kinase regulates growth and survival of a549 human lung adenocarcinoma cells. *FEBS letters* 2007;581:735-740.
- Miyata M, Ito M, Sasajima T, Ohira H, Kasukawa R: Effect of a serotonin receptor antagonist on interleukin-6-induced pulmonary hypertension in rats. *Chest* 2001;119:554-561.
- Molina MF, Whitaker A, Molina PE, McDonough KH: Alcohol does not modulate the augmented acetylcholine-induced vasodilatory response in hemorrhaged rodents. *Shock* 2009;32:601-607.
- Moloney ED, Evans TW: Pathophysiology and pharmacological treatment of pulmonary hypertension in acute respiratory distress syndrome. *The European respiratory journal* 2003;21:720-727.
- Mombouli JV, Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction: From physiology to therapy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1999;31:61-74.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews* 1991;43:109-142.
- Monick MM, Mallampalli RK, Carter AB, Flaherty DM, McCoy D, Robeff PK, Peterson MW, Hunninghake GW: Ceramide regulates lipopolysaccharide-induced phosphatidylinositol 3-kinase and akt activity in human alveolar macrophages. *Journal of immunology* 2001;167:5977-5985.
- Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, Hudson LD: Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *The American review of respiratory disease* 1985;132:485-489.
- Moochhala S, Wu J, Lu J: Hemorrhagic shock: An overview of animal models. *Frontiers in bioscience* 2009;14:4631-4639.
- Moral-Sanz J, Gonzalez T, Menendez C, David M, Moreno L, Macias A, Cortijo J, Valenzuela C, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A: Ceramide inhibits kv currents and contributes to tp-receptor-induced vasoconstriction in rat and human pulmonary arteries. *American journal of physiology Cell physiology* 2011;301:C186-194.
- Moral-Sanz J, Lopez-Lopez JG, Menendez C, Moreno E, Barreira B, Morales-Cano D, Escolano L, Fernandez-Segoviano P, Villamor E, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F, Moreno L: Different patterns of pulmonary vascular disease induced by type 1 diabetes and moderate hypoxia in rats. *Experimental physiology* 2012;97:676-686.
- Moreno L, Moral-Sanz J, Morales-Cano D, Barreira B, Moreno E, Ferrarini A, Pandolfi R, Ruperez FJ, Cortijo J, Sanchez-Luna M, Villamor E, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A: Ceramide mediates acute oxygen sensing in vascular tissues. *Antioxidants & redox signaling* 2014;20:1-14.
- Morris AH, Wallace CJ, Menlove RL, Clemmer TP, Orme JF, Jr., Weaver LK, Dean NC, Thomas F, East TD, Pace NL, Suchyta MR, Beck E, Bombino M, Sittig DF, Bohm S, Hoffmann B, Becks H, Butler S, Pearl J, Rasmusson B: Randomized clinical trial of pressure-controlled inverse ratio ventilation and extracorporeal co2 removal for adult respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994;149:295-305.
- Mulders AC, Peters SL, Michel MC: Sphingomyelin metabolism and endothelial cell function. *European heart journal* 2007;28:777-779.



- Muller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K: Pkc zeta is a molecular switch in signal transduction of tn $\alpha$ , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *The EMBO journal* 1995;14:1961-1969.
- Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N: Identification of the orphan gpcr, p2y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 2008;371:707-712.
- Murata N, Sato K, Kon J, Tomura H, Yanagita M, Kuwabara A, Ui M, Okajima F: Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *The Biochemical journal* 2000;352 Pt 3:809-815.
- Murate T, Suzuki M, Hattori M, Takagi A, Kojima T, Tanizawa T, Asano H, Hotta T, Saito H, Yoshida S, Tamiya-Koizumi K: Up-regulation of acid sphingomyelinase during retinoic acid-induced myeloid differentiation of nb4, a human acute promyelocytic leukemia cell line. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:9936-9943.
- Myers PR, Parker JL, Tanner MA, Adams HR: Effects of cytokines tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1  $\beta$  on endotoxin-mediated inhibition of endothelium-derived relaxing factor bioactivity and nitric oxide production in vascular endothelium. *Shock* 1994;1:73-78.
- Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N: Determination of bacterial load by real-time pcr using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002;148:257-266.
- Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA, Phoon MC, van Rooijen N, Chow VT: Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *The American journal of pathology* 2011;179:199-210.
- Nei T, Urano S, Motoi N, Takizawa J, Kaneko C, Kanazawa H, Tazawa R, Nakagaki K, Akagawa KS, Akasaka K, Ichiwata T, Azuma A, Nakata K: IgM-type gm-csf autoantibody is etiologically a bystander but associated with igg-type autoantibody production in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;302:L959-964.
- Nelson MP, Christmann BS, Dunaway CW, Morris A, Steele C: Experimental pneumocystis lung infection promotes m2a alveolar macrophage-derived mmp12 production. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;303:L469-475.
- Neto AS, Pereira VG, Esposito DC, Damasceno MC, Schultz MJ: Neuromuscular blocking agents in patients with acute respiratory distress syndrome: A summary of the current evidence from three randomized controlled trials. *Annals of intensive care* 2012;2:33.
- Newrzella D, Stoffel W: Functional analysis of the glycosylation of murine acid sphingomyelinase. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:32089-32095.
- Nguyen HA, Rajaram MV, Meyer DA, Schlesinger LS: Pulmonary surfactant protein a and surfactant lipids upregulate irak-m, a negative regulator of tlr-mediated inflammation in human macrophages. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;303:L608-616.
- Ni X, Morales CR: The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic* 2006;7:889-902.
- O'Dea KP, Dokpesi JO, Tatham KC, Wilson MR, Takata M: Regulation of monocyte subset proinflammatory responses within the lung microvasculature by the p38 mapk/mk2 pathway. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;301:L812-821.
- O'Grady NP, Preas HL, Pugin J, Fiuza C, Tropea M, Reda D, Banks SM, Suffredini AF: Local inflammatory responses following bronchial endotoxin instillation in

- humans. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;163:1591-1598.
- O'Neal HR, Jr., Koyama T, Koehler EA, Siew E, Curtis BR, Fremont RD, May AK, Bernard GR, Ware LB: Prehospital statin and aspirin use and the prevalence of severe sepsis and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine* 2011;39:1343-1350.
- Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA: Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 1993;259:1769-1771.
- Oeckler RA, Hubmayr RD: Cell wounding and repair in ventilator injured lungs. *Respiratory physiology & neurobiology* 2008;163:44-53.
- Ogura H, Cioffi WG, Offner PJ, Jordan BS, Johnson AA, Pruitt BA, Jr.: Effect of inhaled nitric oxide on pulmonary function after sepsis in a swine model. *Surgery* 1994;116:313-321.
- Okajima K, Harada N, Sakurai G, Soga Y, Suga H, Terada T, Nakagawa T: Rapid assay for plasma soluble e-selectin predicts the development of acute respiratory distress syndrome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2006;148:295-300.
- Okazaki M, Kreisel F, Richardson SB, Kreisel D, Krupnick AS, Patterson GA, Gelman AE: Sphingosine 1-phosphate inhibits ischemia reperfusion injury following experimental lung transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2007;7:751-758.
- Okazaki T, Bell RM, Hannun YA: Sphingomyelin turnover induced by vitamin d3 in hl-60 cells. Role in cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* 1989;264:19076-19080.
- Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, Spiegel S: Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *The Journal of cell biology* 1999;147:545-558.
- Olson N, Hristova M, Heintz NH, Lounsbury KM, van der Vliet A: Activation of hypoxia-inducible factor-1 protects airway epithelium against oxidant-induced barrier dysfunction. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;301:L993-L1002.
- Ong T, McClintock DE, Kallet RH, Ware LB, Matthay MA, Liu KD: Ratio of angiopoietin-2 to angiopoietin-1 as a predictor of mortality in acute lung injury patients. *Critical care medicine* 2010;38:1845-1851.
- Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttrop N: Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010;181:1294-1309.
- Oskeritzian CA, Alvarez SE, Hait NC, Price MM, Milstien S, Spiegel S: Distinct roles of sphingosine kinases 1 and 2 in human mast-cell functions. *Blood* 2008;111:4193-4200.
- Overgaard CE, Daugherty BL, Mitchell LA, Koval M: Claudins: Control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxidants & redox signaling* 2011;15:1179-1193.
- Overgaard CE, Mitchell LA, Koval M: Roles for claudins in alveolar epithelial barrier function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2012;1257:167-174.
- Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Ohashi Y, Rikitake Y, Inoue N, Hirata KI, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M: Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertension* 2001;37:322-327.
- Pahan K, Sheikh FG, Khan M, Namboodiri AM, Singh I: Sphingomyelinase and ceramide stimulate the expression of inducible nitric-oxide synthase in rat primary astrocytes. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:2591-2600.

- Paine R, 3rd, Standiford TJ, Dechert RE, Moss M, Martin GS, Rosenberg AL, Thannickal VJ, Burnham EL, Brown MB, Hyzy RC: A randomized trial of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor for patients with acute lung injury. *Critical care medicine* 2012;40:90-97.
- Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, Camerer E, Zheng YW, Huang Y, Cyster JG, Coughlin SR: Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 2007;316:295-298.
- Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F, 2nd, Park DR, Pugin J, Skerrett SJ, Hudson LD, Martin TR: Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;164:1896-1903.
- Parker JC: Inhibitors of myosin light chain kinase and phosphodiesterase reduce ventilator-induced lung injury. *Journal of applied physiology* 2000;89:2241-2248.
- Parsons PE, Matthay MA, Ware LB, Eisner MD, National Heart LBIARDSCTN: Elevated plasma levels of soluble tnfr receptors are associated with morbidity and mortality in patients with acute lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2005;288:L426-431.
- Parthasarathi K: Endothelial connexin43 mediates acid-induced increases in pulmonary microvascular permeability. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;303:L33-42.
- Parthasarathi K, Ichimura H, Monma E, Lindert J, Quadri S, Issekutz A, Bhattacharya J: Connexin 43 mediates spread of ca<sup>2+</sup>-dependent proinflammatory responses in lung capillaries. *The Journal of clinical investigation* 2006;116:2193-2200.
- Parton RG, Simons K: The multiple faces of caveolae. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007;8:185-194.
- Payne SG, Oskeritzian CA, Griffiths R, Subramanian P, Barbour SE, Chalfant CE, Milstien S, Spiegel S: The immunosuppressant drug fty720 inhibits cytosolic phospholipase a<sub>2</sub> independently of sphingosine-1-phosphate receptors. *Blood* 2007;109:1077-1085.
- Pelosi P, Tubiolo D, Mascheroni D, Vicardi P, Crotti S, Valenza F, Gattinoni L: Effects of the prone position on respiratory mechanics and gas exchange during acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998;157:387-393.
- Peltz ED, Moore EE, Eckels PC, Damle SS, Tsuruta Y, Johnson JL, Sauaia A, Silliman CC, Banerjee A, Abraham E: Hmgb1 is markedly elevated within 6 hours of mechanical trauma in humans. *Shock* 2009;32:17-22.
- Peng HB, Libby P, Liao JK: Induction and stabilization of i kappa b alpha by nitric oxide mediates inhibition of nf-kappa b. *The Journal of biological chemistry* 1995;270:14214-14219.
- Peng X, Hassoun PM, Sammani S, McVerry BJ, Burne MJ, Rabb H, Pearse D, Tudor RM, Garcia JG: Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2004;169:1245-1251.
- Perrella MA, Edell ES, Krowka MJ, Cortese DA, Burnett JC, Jr.: Endothelium-derived relaxing factor in pulmonary and renal circulations during hypoxia. *The American journal of physiology* 1992;263:R45-50.
- Petrache I, Medler TR, Richter AT, Kamocki K, Chukwueke U, Zhen L, Gu Y, Adamowicz J, Schweitzer KS, Hubbard WC, Berdyshev EV, Lungarella G, Tudor RM: Superoxide dismutase protects against apoptosis and alveolar enlargement induced by ceramide. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2008;295:L44-53.
- Petrache I, Natarajan V, Zhen L, Medler TR, Richter AT, Cho C, Hubbard WC, Berdyshev EV, Tudor RM: Ceramide upregulation causes pulmonary cell

- apoptosis and emphysema-like disease in mice. *Nature medicine* 2005;11:491-498.
- Petronis A: Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature* 2010;465:721-727.
- Pettus BJ, Bielawska A, Subramanian P, Wijesinghe DS, Maceyka M, Leslie CC, Evans JH, Freiberg J, Roddy P, Hannun YA, Chalfant CE: Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase a2. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:11320-11326.
- Pfaff M, Powaga N, Akinci S, Schutz W, Banno Y, Wiegand S, Kummer W, Wess J, Haberberger RV: Activation of the sphk/s1p signalling pathway is coupled to muscarinic receptor-dependent regulation of peripheral airways. *Respiratory research* 2005;6:48.
- Pfeiffer A, Bottcher A, Orso E, Kapinsky M, Nagy P, Bodnar A, Spreitzer I, Liebisch G, Drobnik W, Gempel K, Horn M, Holmer S, Hartung T, Multhoff G, Schutz G, Schindler H, Ulmer AJ, Heine H, Stelter F, Schutt C, Rothe G, Szollosi J, Damjanovich S, Schmitz G: Lipopolysaccharide and ceramide docking to cd14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol* 2001;31:3153-3164.
- Pierpont G, Hale KA, Franciosa JA, Cohn JN: Effects of vasodilators on pulmonary hemodynamics and gas exchange in left ventricular failure. *American heart journal* 1980;99:208-216.
- Ponting CP: Acid sphingomyelinase possesses a domain homologous to its activator proteins: Saposins b and d. *Protein science : a publication of the Protein Society* 1994;3:359-361.
- Predescu SA, Predescu DN, Malik AB: Molecular determinants of endothelial transcytosis and their role in endothelial permeability. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007;293:L823-842.
- Presneill JJ, Harris T, Stewart AG, Cade JF, Wilson JW: A randomized phase ii trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002;166:138-143.
- Price LC, McAuley DF, Marino PS, Finney SJ, Griffiths MJ, Wort SJ: Pathophysiology of pulmonary hypertension in acute lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;302:L803-815.
- Pugin J, Dunn I, Jolliet P, Tassaux D, Magnenat JL, Nicod LP, Chevrolet JC: Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *The American journal of physiology* 1998;275:L1040-1050.
- Pugin J, Widmer MC, Kossodo S, Liang CM, Preas HLn, Suffredini AF: Human neutrophils secrete gelatinase b in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1999;20:458-464.
- Qiu H, Edmunds T, Baker-Malcolm J, Karey KP, Estes S, Schwarz C, Hughes H, Van Patten SM: Activation of human acid sphingomyelinase through modification or deletion of c-terminal cysteine. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:32744-32752.
- Quintern LE, Schuchman EH, Levran O, Suchi M, Ferlinz K, Reinke H, Sandhoff K, Desnick RJ: Isolation of cdna clones encoding human acid sphingomyelinase: Occurrence of alternatively processed transcripts. *The EMBO journal* 1989;8:2469-2473.
- Quinton LJ: Gm-csf: A double dose of protection during pneumonia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;302:L445-446.
- Raymondos K, Martin MU, Schmudlach T, Baus S, Weilbach C, Welte T, Krettek C, Frink M, Hildebrand F: Early alveolar and systemic mediator release in patients at different risks for ards after multiple trauma. *Injury* 2012;43:189-195.

- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S: Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *British journal of pharmacology* 1990;101:746-752.
- Reutershan J, Cagnina RE, Chang D, Linden J, Ley K: Therapeutic anti-inflammatory effects of myeloid cell adenosine receptor a2a stimulation in lipopolysaccharide-induced lung injury. *Journal of immunology* 2007;179:1254-1263.
- Riboni L, Bassi R, Caminiti A, Prinetti A, Viani P, Tettamanti G: Metabolic fate of exogenous sphingosine in neuroblastoma neuro2a cells. Dose-dependence and biological effects. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998;845:46-56.
- Riboni L, Viani P, Bassi R, Prinetti A, Tettamanti G: The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Progress in lipid research* 1997;36:153-195.
- Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M, Early Goal-Directed Therapy Collaborative G: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine* 2001;345:1368-1377.
- Rixen D, Raum M, Holzgraefe B, Sauerland S, Nagelschmidt M, Neugebauer EA, Shock, Trauma Study G: A pig hemorrhagic shock model: Oxygen debt and metabolic acidemia as indicators of severity. *Shock* 2001;16:239-244.
- Rixen D, Siegel JH: Bench-to-bedside review: Oxygen debt and its metabolic correlates as quantifiers of the severity of hemorrhagic and post-traumatic shock. *Critical care* 2005;9:441-453.
- Rocco PR, Dos Santos C, Pelosi P: Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome. *Minerva anesthesiologica* 2009;75:730-740.
- Rocco PR, Souza AB, Faffe DS, Passaro CP, Santos FB, Negri EM, Lima JG, Contador RS, Capelozzi VL, Zin WA: Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003;168:677-684.
- Rodriguez-Lafrasse C, Vanier MT: Sphingosylphosphorylcholine in niemann-pick disease brain: Accumulation in type a but not in type b. *Neurochemical research* 1999;24:199-205.
- Rokkam D, Lafemina MJ, Lee JW, Matthay MA, Frank JA: Claudin-4 levels are associated with intact alveolar fluid clearance in human lungs. *The American journal of pathology* 2011;179:1081-1087.
- Romiti E, Vasta V, Meacci E, Farnararo M, Linke T, Ferlinz K, Sandhoff K, Bruni P: Characterization of sphingomyelinase activity released by thrombin-stimulated platelets. *Molecular and cellular biochemistry* 2000;205:75-81.
- Ronn T, Lendemans S, de Groot H, Petrat F: A new model of severe hemorrhagic shock in rats. *Comparative medicine* 2011;61:419-426.
- Rose R, Kheirabadi BS, Klemcke HG: Arterial blood gases, electrolytes, and metabolic indices associated with hemorrhagic shock: Inter- and intrainbred rat strain variation. *Journal of applied physiology* 2013;114:1165-1173.
- Rossaint R, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernandez-Mondejar E, Gordini G, Stahel PF, Hunt BJ, Neugebauer E, Spahn DR: Key issues in advanced bleeding care in trauma. *Shock* 2006;26:322-331.
- Rossi JL, Velentza AV, Steinhorn DM, Watterson DM, Wainwright MS: Mlck210 gene knockout or kinase inhibition preserves lung function following endotoxin-induced lung injury in mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007;292:L1327-1334.
- Rossi P, Persson B, Boels PJ, Arner A, Weitzberg E, Oldner A: Endotoxemic pulmonary hypertension is largely mediated by endothelin-induced venous constriction. *Intensive care medicine* 2008;34:873-880.
- Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD: Incidence and outcomes of acute lung injury. *The New England journal of medicine* 2005;353:1685-1693.

- Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G: Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 2002;346:896-903.
- Rushing GD, Britt LD: Reperfusion injury after hemorrhage: A collective review. *Annals of surgery* 2008;247:929-937.
- Russell DH, Barreto JC, Klemm K, Miller TA: Hemorrhagic shock increases gut macromolecular permeability in the rat. *Shock* 1995;4:50-55.
- Ruvolo PP: Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 2003;47:383-392.
- Ryan AJ, McCoy DM, McGowan SE, Salome RG, Mallampalli RK: Alveolar sphingolipids generated in response to tnfr-alpha modifies surfactant biophysical activity. *Journal of applied physiology* 2003;94:253-258.
- Ryan D, Frohlich S, McLoughlin P: Pulmonary vascular dysfunction in ards. *Annals of intensive care* 2014;4:28.
- Sabharwal AK, Bajaj SP, Ameri A, Tricomi SM, Hyers TM, Dahms TE, Taylor FB, Jr., Bajaj MS: Tissue factor pathway inhibitor and von willebrand factor antigen levels in adult respiratory distress syndrome and in a primate model of sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995;151:758-767.
- Saddoughi SA, Gencer S, Peterson YK, Ward KE, Mukhopadhyay A, Oaks J, Bielawski J, Szulc ZM, Thomas RJ, Selvam SP, Senkal CE, Garrett-Mayer E, De Palma RM, Fedarovich D, Liu A, Habib AA, Stahelin RV, Perrotti D, Ogretmen B: Sphingosine analogue drug fty720 targets i2pp2a/set and mediates lung tumour suppression via activation of pp2a-ripk1-dependent necroptosis. *EMBO molecular medicine* 2013;5:105-121.
- Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, Lohmeyer J, Preissner KT: Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. *PloS one* 2012;7:e32366.
- Sakamoto K, Hashimoto N, Kondoh Y, Imaizumi K, Aoyama D, Kohnoh T, Kusunose M, Kimura M, Kawabe T, Taniguchi H, Hasegawa Y: Differential modulation of surfactant protein d under acute and persistent hypoxia in acute lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;303:L43-53.
- Sakaue M, Hoffman BB: Glucocorticoids induce transcription and expression of the alpha 1b adrenergic receptor gene in dt1 mf-2 smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation* 1991;88:385-389.
- Samad F, Hester KD, Yang G, Hannun YA, Bielawski J: Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: A potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes* 2006;55:2579-2587.
- Sanchez M, Lodi F, Vera R, Villar IC, Cogolludo A, Jimenez R, Moreno L, Romero M, Tamargo J, Perez-Vizcaino F, Duarte J: Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and overexpression of p47phox induced by angiotensin ii in rat aorta. *The Journal of nutrition* 2007;137:910-915.
- Sandvig K, Spilsberg B, Lauvrak SU, Torgersen ML, Iversen TG, van Deurs B: Pathways followed by protein toxins into cells. *International journal of medical microbiology : IJMM* 2004;293:483-490.
- Sathishkumar S, Boyanovsky B, Karakashian AA, Rozenova K, Giltiay NV, Kudrimoti M, Mohiuddin M, Ahmed MM, Nikolova-Karakashian M: Elevated sphingomyelinase activity and ceramide concentration in serum of patients undergoing high dose spatially fractionated radiation treatment: Implications for endothelial apoptosis. *Cancer biology & therapy* 2005;4:979-986.

- Sato H, Tanaka T, Kita T, Tanaka N: A quantitative study of lung dysfunction following haemorrhagic shock in rats. *International journal of experimental pathology* 2010;91:267-275.
- Sato Y, Weil MH, Tang W: Tissue hypercarbic acidosis as a marker of acute circulatory failure (shock). *Chest* 1998;114:263-274.
- Savale L, Tu L, Rideau D, Izziki M, Maitre B, Adnot S, Eddahibi S: Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respiratory research* 2009;10:6.
- Sawada M, Nakashima S, Kiyono T, Yamada J, Hara S, Nakagawa M, Shinoda J, Sakai N: Acid sphingomyelinase activation requires caspase-8 but not p53 nor reactive oxygen species during fas-induced apoptosis in human glioma cells. *Experimental cell research* 2002;273:157-168.
- Scarpati EM, Sadler JE: Regulation of endothelial cell coagulant properties. Modulation of tissue factor, plasminogen activator inhibitors, and thrombomodulin by phorbol 12-myristate 13-acetate and tumor necrosis factor. *The Journal of biological chemistry* 1989;264:20705-20713.
- Schaefer TJ, Wolford RW: Disorders of potassium. *Emergency medicine clinics of North America* 2005;23:723-747, viii-ix.
- Schissel SL, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I: Zn<sup>2+</sup>-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:18431-18436.
- Schromm AB, Brandenburg K, Loppnow H, Moran AP, Koch MH, Rietschel ET, Seydel U: Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid a portion. *European journal of biochemistry / FEBS* 2000;267:2008-2013.
- Schuchman EH, Suchi M, Takahashi T, Sandhoff K, Desnick RJ: Human acid sphingomyelinase. Isolation, nucleotide sequence and expression of the full-length and alternatively spliced cdnas. *The Journal of biological chemistry* 1991;266:8531-8539.
- Schuster DP, Anderson C, Kozlowski J, Lange N: Regional pulmonary perfusion in patients with acute pulmonary edema. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2002;43:863-870.
- Schutze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Kronke M: Tnf activates nf-kappa b by phosphatidylcholine-specific phospholipase c-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 1992;71:765-776.
- Schwandner R, Wiegmann K, Bernardo K, Kreder D, Kronke M: Tnf receptor death domain-associated proteins tradd and fadd signal activation of acid sphingomyelinase. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:5916-5922.
- Schwerer B: Antibodies against gangliosides: A link between preceding infection and immunopathogenesis of guillain-barre syndrome. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2002;4:373-384.
- Seeley E, McAuley DF, Eisner M, Miletin M, Matthay MA, Kallet RH: Predictors of mortality in acute lung injury during the era of lung protective ventilation. *Thorax* 2008;63:994-998.
- Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ: Inflection points in sepsis biology: From local defense to systemic organ injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;303:L355-363.
- Senchenkov A, Litvak DA, Cabot MC: Targeting ceramide metabolism--a strategy for overcoming drug resistance. *Journal of the National Cancer Institute* 2001;93:347-357.
- Seong SY, Matzinger P: Hydrophobicity: An ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature reviews Immunology* 2004;4:469-478.
- Serrato RV: Lipopolysaccharides in diazotrophic bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2014;4:119.

- Shah C, Yang G, Lee I, Bielawski J, Hannun YA, Samad F: Protection from high fat diet-induced increase in ceramide in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *The Journal of biological chemistry* 2008;283:13538-13548.
- Shaifta Y, Snetkov VA, Prieto-Lloret J, Knock GA, Smirnov SV, Aaronson PI, Ward JP: Sphingosylphosphorylcholine potentiates vasoreactivity and voltage-gated  $ca^{2+}$  entry via nox1 and reactive oxygen species. *Cardiovascular research* 2015;106:121-130.
- Shinghal R, Scheller RH, Bajjalieh SM: Ceramide 1-phosphate phosphatase activity in brain. *Journal of neurochemistry* 1993;61:2279-2285.
- Shirakabe K, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Matsuda S, Moriguchi T, Gotoh Y, Matsumoto K, Nishida E: Tak1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-jun n-terminal kinase. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:8141-8144.
- Shires GT, Barber AE, Illner HP: Current status of resuscitation: Solutions including hypertonic saline. *Advances in surgery* 1995;28:133-170.
- Shires T, Coln D, Carrico J, Lightfoot S: Fluid therapy in hemorrhagic shock. *Archives of surgery* 1964;88:688-693.
- Shyamsundar M, McKeown ST, O'Kane CM, Craig TR, Brown V, Thickett DR, Matthay MA, Taggart CC, Backman JT, Elborn JS, McAuley DF: Simvastatin decreases lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in healthy volunteers. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009;179:1107-1114.
- Sihler KC, Napolitano LM: Complications of massive transfusion. *Chest* 2010;137:209-220.
- Simonaro CM, Park JH, Eliyahu E, Shtraizent N, McGovern MM, Schuchman EH: Imprinting at the *smpd1* locus: Implications for acid sphingomyelinase-deficient niemann-pick disease. *American journal of human genetics* 2006;78:865-870.
- Simons K, Ikonen E: Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997;387:569-572.
- Singla S, Jacobson JR: Statins as a novel therapeutic strategy in acute lung injury. *Pulmonary circulation* 2012;2:397-406.
- Singleton PA, Moreno-Vinasco L, Sammani S, Wanderling SL, Moss J, Garcia JG: Attenuation of vascular permeability by methylxanthines: Role of mop-r and s1p3 transactivation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2007;37:222-231.
- Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M: Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:26796-26803.
- Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT, Myles C, Zhu S, Goodman RB, Hudson LD, Matalon S, Martin TR: Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;163:503-510.
- Smith AP, Demoncheaux EA, Higenbottam TW: Nitric oxide gas decreases endothelin-1 mRNA in cultured pulmonary artery endothelial cells. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 2002;6:153-159.
- Smith AR, Visioli F, Frei B, Hagen TM: Age-related changes in endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and nitric oxide dependent vasodilation: Evidence for a novel mechanism involving sphingomyelinase and ceramide-activated phosphatase 2a. *Aging Cell* 2006;5:391-400.
- Snetkov VA, Thomas GD, Teague B, Leach RM, Shaifta Y, Knock GA, Aaronson PI, Ward JP: Low concentrations of sphingosylphosphorylcholine enhance pulmonary artery vasoreactivity: The role of protein kinase c delta and  $ca^{2+}$  entry. *Hypertension* 2008;51:239-245.
- Soehnlein O, Lindbom L: Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews Immunology* 2010;10:427-439.



- Spiegel S, English D, Milstien S: Sphingosine 1-phosphate signaling: Providing cells with a sense of direction. *Trends in cell biology* 2002;12:236-242.
- Spiegel S, Milstien S: Sphingosine-1-phosphate: An enigmatic signalling lipid. *Nature reviews Molecular cell biology* 2003;4:397-407.
- Spohr F, Cornelissen AJ, Busch C, Gebhard MM, Motsch J, Martin EO, Weimann J: Role of endogenous nitric oxide in endotoxin-induced alteration of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2005;289:H823-831.
- Standiford LR, Standiford TJ, Newstead MJ, Zeng X, Ballinger MN, Kovach MA, Reka AK, Bhan U: Tlr4-dependent gm-csf protects against lung injury in gram-negative bacterial pneumonia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;302:L447-454.
- Staub NC: Pulmonary edema. *Physiological reviews* 1974;54:678-811.
- Stein HJ, Hinder RA, Oosthuizen MM: Gastric mucosal injury caused by hemorrhagic shock and reperfusion: Protective role of the antioxidant glutathione. *Surgery* 1990;108:467-473; discussion 473-464.
- Steinberg KP, Hudson LD, Goodman RB, Hough CL, Lanken PN, Hyzy R, Thompson BT, Ancukiewicz M, National Heart L, Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome Clinical Trials N: Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 2006;354:1671-1684.
- Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, Mark EJ, Hales CA, Waxman AB: Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circulation research* 2009;104:236-244, 228p following 244.
- Stern JB, Fierobe L, Paugam C, Rolland C, Dehoux M, Petiet A, Dombret MC, Mantz J, Aubier M, Crestani B: Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor in bronchoalveolar lavage fluid in acute respiratory distress syndrome patients. *Critical care medicine* 2000;28:2326-2333.
- Steudel W, Ichinose F, Huang PL, Hurford WE, Jones RC, Bevan JA, Fishman MC, Zapol WM: Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase (nos 3) gene. *Circulation research* 1997;81:34-41.
- Strieter RM, Kunkel SL: Acute lung injury: The role of cytokines in the elicitation of neutrophils. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 1994;42:640-651.
- Sturrock A, Seedahmed E, Mir-Kasimov M, Boltax J, McManus ML, Paine R, 3rd: Gm-csf provides autocrine protection for murine alveolar epithelial cells from oxidant-induced mitochondrial injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;302:L343-351.
- Su X: Leading neutrophils to the alveoli: Who is the guider? *American journal of respiratory and critical care medicine* 2012;186:472-473.
- Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP: Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiological reviews* 2012;92:367-520.
- Szabo C: Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New horizons* 1995;3:2-32.
- Sznajder JI, Fraiman A, Hall JB, Sanders W, Schmidt G, Crawford G, Nahum A, Factor P, Wood LD: Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Chest* 1989;96:606-612.
- Tafesse FG, Ternes P, Holthuis JC: The multigenic sphingomyelin synthase family. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:29421-29425.
- Taha TA, Hannun YA, Obeid LM: Sphingosine kinase: Biochemical and cellular regulation and role in disease. *Journal of biochemistry and molecular biology* 2006;39:113-131.
- Takahashi T, Abe T, Sato T, Miura K, Takahashi I, Yano M, Watanabe A, Imashuku S, Takada G: Elevated sphingomyelinase and hypercytokinemia in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Journal of pediatric hematology/oncology* 2002;24:401-404.

- Takenaka K, Nishimura Y, Nishiuma T, Sakashita A, Yamashita T, Kobayashi K, Satouchi M, Ishida T, Kawashima S, Yokoyama M: Ventilator-induced lung injury is reduced in transgenic mice that overexpress endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2006;290:L1078-1086.
- Tang D, Kang R, Xiao W, Zhang H, Lotze MT, Wang H, Xiao X: Quercetin prevents lps-induced high-mobility group box 1 release and proinflammatory function. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2009;41:651-660.
- Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS: Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for escherichia and salmonella lipopolysaccharides. *Journal of immunology* 2000;165:5780-5787.
- Taveira da Silva AM, Kaulbach HC, Chuidian FS, Lambert DR, Suffredini AF, Danner RL: Brief report: Shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of salmonella endotoxin. *The New England journal of medicine* 1993;328:1457-1460.
- Tellier P: Aminorex to fen/phen: An epidemic foretold. *Circulation* 1999;100:e146; author reply e147.
- Terkildsen JR, Crampin EJ, Smith NP: The balance between inactivation and activation of the na<sup>+</sup>-k<sup>+</sup> pump underlies the triphasic accumulation of extracellular k<sup>+</sup> during myocardial ischemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2007;293:H3036-3045.
- Testai FD, Landek MA, Goswami R, Ahmed M, Dawson G: Acid sphingomyelinase and inhibition by phosphate ion: Role of inhibition by phosphatidyl-myoinositol 3,4,5-triphosphate in oligodendrocyte cell signaling. *Journal of neurochemistry* 2004;89:636-644.
- Tettamanti G: Ganglioside/glycosphingolipid turnover: New concepts. *Glycoconjugate journal* 2004;20:301-317.
- Thickett DR, Armstrong L, Christie SJ, Millar AB: Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;164:1601-1605.
- Thickett DR, Armstrong L, Millar AB: A role for vascular endothelial growth factor in acute and resolving lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002;166:1332-1337.
- Thompson BT: Glucocorticoids and acute lung injury. *Critical care medicine* 2003;31:S253-257.
- Tibboel J, Reiss I, de Jongste JC, Post M: Sphingolipids in lung growth and repair. *Chest* 2014;145:120-128.
- Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ: Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *The Journal of experimental medicine* 1986;164:777-793.
- Tomashefski JF, Jr., Davies P, Boggis C, Greene R, Zapol WM, Reid LM: The pulmonary vascular lesions of the adult respiratory distress syndrome. *The American journal of pathology* 1983;112:112-126.
- Tomiuk S, Hofmann K, Nix M, Zumbansen M, Stoffel W: Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: Functions in sphingolipid signaling? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:3638-3643.
- Torres Filho IP, Torres LN, Pittman RN: Early physiologic responses to hemorrhagic hypotension. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2010;155:78-88.
- Torres LN, Torres Filho IP, Barbee RW, Tiba MH, Ward KR, Pittman RN: Systemic responses to prolonged hemorrhagic hypotension. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2004;286:H1811-1820.
- Tsokos M, Fehlauer F, Puschel K: Immunohistochemical expression of e-selectin in sepsis-induced lung injury. *International journal of legal medicine* 2000;113:338-342.

- Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, Critchlow ND, Nakao A, Chan MH, Lotze MT, Geller DA, Billiar TR: Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional tlr4 signaling in nonparenchymal cells. *Journal of immunology* 2005;175:7661-7668.
- Tsushima K, King LS, Aggarwal NR, De Gorordo A, D'Alessio FR, Kubo K: Acute lung injury review. *Internal medicine* 2009;48:621-630.
- Tung SH, Wang BC, Brown EB, Jr.: Intracellular and extracellular acid-base changes in hemorrhagic shock. *Respiration physiology* 1976;26:229-237.
- Uhlig S, Goggel R, Engel S: Mechanisms of platelet-activating factor (paf)-mediated responses in the lung. *Pharmacological reports : PR* 2005;57 Suppl:206-221.
- Uhlig S, Gulbins E: Sphingolipids in the lungs. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008;178:1100-1114.
- Ullian ME: The role of corticosteroids in the regulation of vascular tone. *Cardiovascular research* 1999;41:55-64.
- Ullrich R, Bloch KD, Ichinose F, Steudel W, Zapol WM: Hypoxic pulmonary blood flow redistribution and arterial oxygenation in endotoxin-challenged nos2-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 1999;104:1421-1429.
- Unkel B, Hoegner K, Clausen BE, Lewe-Schlosser P, Bodner J, Gattenloehner S, Janssen H, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S: Alveolar epithelial cells orchestrate dc function in murine viral pneumonia. *The Journal of clinical investigation* 2012;122:3652-3664.
- Vadasz I, Raviv S, Sznajder JI: Alveolar epithelium and na,k-atpase in acute lung injury. *Intensive care medicine* 2007;33:1243-1251.
- Van der Linden P, Rausin I, Deltell A, Bekrar Y, Gilbert E, Bakker J, Vincent JL: Detection of tissue hypoxia by arteriovenous gradient for pco2 and ph in anesthetized dogs during progressive hemorrhage. *Anesthesia and analgesia* 1995;80:269-275.
- van Heerden PV, Barden A, Michalopoulos N, Bulsara MK, Roberts BL: Dose-response to inhaled aerosolized prostacyclin for hypoxemia due to ards. *Chest* 2000;117:819-827.
- Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB: Regulation of endothelial junctional permeability. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008;1123:134-145.
- Vane JR, Anggard EE, Botting RM: Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England journal of medicine* 1990;323:27-36.
- Vassar MJ, Perry CA, Holcroft JW: Prehospital resuscitation of hypotensive trauma patients with 7.5% nacl versus 7.5% nacl with added dextran: A controlled trial. *The Journal of trauma* 1993;34:622-632; discussion 632-623.
- Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, Bielawska A, Obeid LM: Role of ceramide in cellular senescence. *The Journal of biological chemistry* 1995;270:30701-30708.
- Venkataraman K, Thangada S, Michaud J, Oo ML, Ai Y, Lee YM, Wu M, Parikh NS, Khan F, Proia RL, Hla T: Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular s1p gradient. *The Biochemical journal* 2006;397:461-471.
- Verghese GM, McCormick-Shannon K, Mason RJ, Matthay MA: Hepatocyte growth factor and keratinocyte growth factor in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury. Biologic and clinical significance. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998;158:386-394.
- Villamor E, Perez-Vizcaino F, Ruiz T, Leza JC, Moro M, Tamargo J: Group b streptococcus and e. Coli lps-induced no-dependent hyporesponsiveness to noradrenaline in isolated intrapulmonary arteries of neonatal piglets. *British journal of pharmacology* 1995;115:261-266.
- Villar J, Perez-Mendez L, Espinosa E, Flores C, Blanco J, Muriel A, Basaldua S, Muros M, Blanch L, Artigas A, Kacmarek RM, Grecia, Groups G-S: Serum lipopolysaccharide binding protein levels predict severity of lung injury and mortality in patients with severe sepsis. *PloS one* 2009;4:e6818.

- Villar J, Slutsky AS: The incidence of the adult respiratory distress syndrome. The American review of respiratory disease 1989;140:814-816.
- Vivekananda J, Smith D, King RJ: Sphingomyelin metabolites inhibit sphingomyelin synthase and ctp:Phosphocholine cytidyltransferase. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology 2001;281:L98-L107.
- Vlahakis NE, Hubmayr RD: Cellular stress failure in ventilator-injured lungs. American journal of respiratory and critical care medicine 2005;171:1328-1342.
- Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, Hubmayr RD: Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. The American journal of physiology 1999;277:L167-173.
- Vlahakis NE, Schroeder MA, Pagano RE, Hubmayr RD: Deformation-induced lipid trafficking in alveolar epithelial cells. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology 2001;280:L938-946.
- von Bismarck P, Klemm K, Wistadt CF, Winoto-Morbach S, Uhlig U, Schutze S, Uhlig S, Lachmann B, Krause MF: Surfactant "fortification" by topical inhibition of nuclear factor-kappaB activity in a newborn piglet lavage model. Critical care medicine 2007;35:2309-2318.
- von Bismarck P, Wistadt CF, Klemm K, Winoto-Morbach S, Uhlig U, Schutze S, Adam D, Lachmann B, Uhlig S, Krause MF: Improved pulmonary function by acid sphingomyelinase inhibition in a newborn piglet lavage model. American journal of respiratory and critical care medicine 2008;177:1233-1241.
- Wada T, Jesmin S, Gando S, Yanagida Y, Mizugaki A, Sultana SN, Zaedi S, Yokota H: The role of angiogenic factors and their soluble receptors in acute lung injury (ALI)/ acute respiratory distress syndrome (ARDS) associated with critical illness. Journal of inflammation 2013;10:6.
- Wainwright MS, Rossi J, Schavocky J, Crawford S, Steinhorn D, Velentza AV, Zasadzki M, Shirinsky V, Jia Y, Haiech J, Van Eldik LJ, Watterson DM: Protein kinase involved in lung injury susceptibility: Evidence from enzyme isoform genetic knockout and in vivo inhibitor treatment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003;100:6233-6238.
- Walmrath D, Schneider T, Schermuly R, Olschewski H, Grimminger F, Seeger W: Direct comparison of inhaled nitric oxide and aerosolized prostacyclin in acute respiratory distress syndrome. American journal of respiratory and critical care medicine 1996;153:991-996.
- Wang G, Silva J, Krishnamurthy K, Tran E, Condie BG, Bieberich E: Direct binding to ceramide activates protein kinase C $\zeta$  before the formation of a pro-apoptotic complex with par-4 in differentiating stem cells. The Journal of biological chemistry 2005;280:26415-26424.
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ: Hmg-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science 1999;285:248-251.
- Wang HL, Akinci IO, Baker CM, Urich D, Bellmeyer A, Jain M, Chandel NS, Mutlu GM, Budinger GR: The intrinsic apoptotic pathway is required for lipopolysaccharide-induced lung endothelial cell death. Journal of immunology 2007;179:1834-1841.
- Wang L, Dudek SM: Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. Microvascular research 2009;77:39-45.
- Wang L, Yin J, Nickles HT, Ranke H, Tabuchi A, Hoffmann J, Tabeling C, Barbosa-Sicard E, Chanson M, Kwak BR, Shin HS, Wu S, Isakson BE, Witzenrath M, de Wit C, Fleming I, Kuppe H, Kuebler WM: Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires connexin 40-mediated endothelial signal conduction. The Journal of clinical investigation 2012;122:4218-4230.
- Wang S, Singh RD, Godin L, Pagano RE, Hubmayr RD: Endocytic response of type I alveolar epithelial cells to hypertonic stress. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology 2011;300:L560-568.

- Ward JP: Curiouser and curiouser: The perplexing conundrum of reactive oxygen species and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Experimental physiology* 2007;92:819-820.
- Ward RT, Colton DM, Meade PC, Henry JC, Contreras LM, Wilson OM, Fleming AW: Serum levels of calcium and albumin in survivors versus nonsurvivors after critical injury. *Journal of critical care* 2004;19:54-64.
- Ware LB, Eisner MD, Thompson BT, Parsons PE, Matthay MA: Significance of von willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2004;170:766-772.
- Ware LB, Fang X, Matthay MA: Protein c and thrombomodulin in human acute lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2003;285:L514-521.
- Ware LB, Matthay MA: The acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 2000;342:1334-1349.
- Ware LB, Matthay MA: Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;163:1376-1383.
- Ware LB, Matthay MA: Clinical practice. Acute pulmonary edema. *The New England journal of medicine* 2005;353:2788-2796.
- Watterson K, Sankala H, Milstien S, Spiegel S: Pleiotropic actions of sphingosine-1-phosphate. *Progress in lipid research* 2003;42:344-357.
- Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT: Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circulation research* 2001;88:1259-1266.
- Waypa GB, Schumacker PT: Hypoxic pulmonary vasoconstriction: Redox events in oxygen sensing. *Journal of applied physiology* 2005;98:404-414.
- Webb JG, Tan Y, Jaffa MA, Jaffa AA: Evidence for prostacyclin and camp upregulation by bradykinin and insulin-like growth factor 1 in vascular smooth muscle cells. *Journal of receptor and signal transduction research* 2010;30:61-71.
- Weir EK, Mlczech J, Reeves JT, Grover RF: Endotoxin and prevention of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1976;88:975-983.
- Weissmann N, Zeller S, Schafer RU, Turowski C, Ay M, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L, Seeger W, Grimminger F: Impact of mitochondria and nadph oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2006;34:505-513.
- Wheeler AP, Bernard GR: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: A clinical review. *Lancet* 2007;369:1553-1564.
- Wiedermann FJ, Mayr AJ, Kaneider NC, Fuchs D, Mutz NJ, Schobersberger W: Alveolar granulocyte colony-stimulating factor and alpha-chemokines in relation to serum levels, pulmonary neutrophilia, and severity of lung injury in ards. *Chest* 2004;125:212-219.
- Wiegmann K, Schutze S, Machleidt T, Witte D, Kronke M: Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 1994;78:1005-1015.
- Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Matthay MA: Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to escherichia coli endotoxin. *The Journal of clinical investigation* 1991;88:864-875.
- Wiggs BR, English D, Quinlan WM, Doyle NA, Hogg JC, Doerschuk CM: Contributions of capillary pathway size and neutrophil deformability to neutrophil transit through rabbit lungs. *Journal of applied physiology* 1994;77:463-470.
- Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA: Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Critical care medicine* 2000;28:143-149.

- Wolfson RK, Chiang ET, Garcia JG: Hmgb1 induces human lung endothelial cell cytoskeletal rearrangement and barrier disruption. *Microvascular research* 2011;81:189-197.
- Wolters PJ, Wray C, Sutherland RE, Kim SS, Koff J, Mao Y, Frank JA: Neutrophil-derived il-6 limits alveolar barrier disruption in experimental ventilator-induced lung injury. *Journal of immunology* 2009;182:8056-8062.
- Won JS, Im YB, Khan M, Singh AK, Singh I: The role of neutral sphingomyelinase produced ceramide in lipopolysaccharide-mediated expression of inducible nitric oxide synthase. *Journal of neurochemistry* 2004;88:583-593.
- Wong ML, Xie B, Beatini N, Phu P, Marathe S, Johns A, Gold PW, Hirsch E, Williams KJ, Licinio J, Tabas I: Acute systemic inflammation up-regulates secretory sphingomyelinase in vivo: A possible link between inflammatory cytokines and atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:8681-8686.
- Wort SJ, Evans TW: The role of the endothelium in modulating vascular control in sepsis and related conditions. *British medical bulletin* 1999;55:30-48.
- Wright SC, Zheng H, Zhong J: Tumor cell resistance to apoptosis due to a defect in the activation of sphingomyelinase and the 24 kda apoptotic protease (ap24). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1996;10:325-332.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: Cd14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (lps) and lps binding protein. *Science* 1990;249:1431-1433.
- Wu GS, Saftig P, Peters C, El-Deiry WS: Potential role for cathepsin d in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity. *Oncogene* 1998;16:2177-2183.
- Wu Q, Jiang D, Minor MN, Martin RJ, Chu HW: In vivo function of airway epithelial tlr2 in host defense against bacterial infection. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011a;300:L579-586.
- Wu W, Patel KB, Booth JL, Zhang W, Metcalf JP: Cigarette smoke extract suppresses the rig-i-initiated innate immune response to influenza virus in the human lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011b;300:L821-830.
- Yamaji T, Kumagai K, Tomishige N, Hanada K: Two sphingolipid transfer proteins, cert and fapp2: Their roles in sphingolipid metabolism. *IUBMB life* 2008;60:511-518.
- Yang AH, Ishii I, Chun J: In vivo roles of lysophospholipid receptors revealed by gene targeting studies in mice. *Biochimica et biophysica acta* 2002;1582:197-203.
- Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L, Wang H, DiRaimo R, Czura CJ, Wang H, Roth J, Warren HS, Fink MP, Fenton MJ, Andersson U, Tracey KJ: Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:296-301.
- Yang R, Harada T, Mollen KP, Prince JM, Levy RM, Englert JA, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Yang H, Tracey KJ, Harbrecht BG, Billiar TR, Fink MP: Anti-hmgb1 neutralizing antibody ameliorates gut barrier dysfunction and improves survival after hemorrhagic shock. *Molecular medicine* 2006;12:105-114.
- Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H: Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1996;27:838-844.
- Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ: Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 1998;395:284-288.
- Yang Y, Yin J, Baumgartner W, Samapati R, Solymosi EA, Reppien E, Kuebler WM, Uhlig S: Platelet-activating factor reduces endothelial nitric oxide production:

- Role of acid sphingomyelinase. *The European respiratory journal* 2010;36:417-427.
- Yatomi Y, Ozaki Y, Ohmori T, Igarashi Y: Sphingosine 1-phosphate: Synthesis and release. *Prostaglandins & other lipid mediators* 2001;64:107-122.
- Yu M, Levy MM, Smith P, Takiguchi SA, Miyasaki A, Myers SA: Effect of maximizing oxygen delivery on morbidity and mortality rates in critically ill patients: A prospective, randomized, controlled study. *Critical care medicine* 1993;21:830-838.
- Yu SP: Na(+), k(+)-atpase: The new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochemical pharmacology* 2003;66:1601-1609.
- Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP: Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *The American journal of physiology* 1993;264:L116-123.
- Yuki N: Infectious origins of, and molecular mimicry in, guillain-barre and fisher syndromes. *The Lancet Infectious diseases* 2001;1:29-37.
- Yumoto R, Nishikawa H, Okamoto M, Katayama H, Nagai J, Takano M: Clathrin-mediated endocytosis of fitc-albumin in alveolar type ii epithelial cell line rle-6tn. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2006;290:L946-955.
- Zambon M, Vincent JL: Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time. *Chest* 2008;133:1120-1127.
- Zamjahn JB, Quinton LJ, Mack JC, Frevert CW, Nelson S, Bagby GJ: Differential flux of macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant from the lung after intrapulmonary delivery. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;301:L568-574.
- Zapol WM, Kobayashi K, Snider MT, Greene R, Laver MB: Vascular obstruction causes pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *Chest* 1977;71:306-307.
- Zapol WM, Rimar S, Gillis N, Marletta M, Bosken CH: Nitric oxide and the lung. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994;149:1375-1380.
- Zapol WM, Snider MT: Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *The New England journal of medicine* 1977;296:476-480.
- Zapol WM, Snider MT, Hill JD, Fallat RJ, Bartlett RH, Edmunds LH, Morris AH, Peirce EC, 2nd, Thomas AN, Proctor HJ, Drinker PA, Pratt PC, Bagniewski A, Miller RG, Jr.: Extracorporeal membrane oxygenation in severe acute respiratory failure. A randomized prospective study. *Jama* 1979;242:2193-2196.
- Zarbock A, Singbartl K, Ley K: Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *The Journal of clinical investigation* 2006;116:3211-3219.
- Zebda N, Dubrovskyi O, Birukov KG: Focal adhesion kinase regulation of mechanotransduction and its impact on endothelial cell functions. *Microvascular research* 2012;83:71-81.
- Zeidan YH, Hannun YA: Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase cdelta-mediated phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:11549-11561.
- Zeidan YH, Jenkins RW, Hannun YA: Remodeling of cellular cytoskeleton by the acid sphingomyelinase/ceramide pathway. *The Journal of cell biology* 2008a;181:335-350.
- Zeidan YH, Wu BX, Jenkins RW, Obeid LM, Hannun YA: A novel role for protein kinase cdelta-mediated phosphorylation of acid sphingomyelinase in uv light-induced mitochondrial injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008b;22:183-193.

- Zelenkov P, McLoughlin T, Johns RA: Endotoxin enhances hypoxic constriction of rat aorta and pulmonary artery through induction of edrf/no synthase. *The American journal of physiology* 1993;265:L346-354.
- Zeyed YF, Bastarache JA, Matthay MA, Ware LB: The severity of shock is associated with impaired rates of net alveolar fluid clearance in clinical acute lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2012;303:L550-555.
- Zhang J, Terreni L, De Simoni MG, Dunn AJ: Peripheral interleukin-6 administration increases extracellular concentrations of serotonin and the evoked release of serotonin in the rat striatum. *Neurochemistry international* 2001;38:303-308.
- Zhang L, Kumar S, Kaminski A, Kasch C, Sponholz C, Stamm C, Ladilov Y, Steinhoff G: Importance of endothelial nitric oxide synthase for the hypothermic protection of lungs against ischemia-reperfusion injury. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2006;131:969-974.
- Zhang S, Rahman M, Zhang S, Qi Z, Herwald H, Thorlacius H: Simvastatin regulates cxc chemokine formation in streptococcal m1 protein-induced neutrophil infiltration in the lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;300:L930-939.
- Zhao Y, Kalari SK, Usatyuk PV, Gorshkova I, He D, Watkins T, Brindley DN, Sun C, Bittman R, Garcia JG, Berdyshev EV, Natarajan V: Intracellular generation of sphingosine 1-phosphate in human lung endothelial cells: Role of lipid phosphate phosphatase-1 and sphingosine kinase 1. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:14165-14177.
- Zhao Y, Sharma AK, LaPar DJ, Kron IL, Ailawadi G, Liu Y, Jones DR, Laubach VE, Lau CL: Depletion of tissue plasminogen activator attenuates lung ischemia-reperfusion injury via inhibition of neutrophil extravasation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;300:L718-729.
- Zhong Z, Enomoto N, Connor HD, Moss N, Mason RP, Thurman RG: Glycine improves survival after hemorrhagic shock in the rat. *Shock* 1999;12:54-62.
- Zhu S, Ware LB, Geiser T, Matthay MA, Matalon S: Increased levels of nitrate and surfactant protein a nitration in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;163:166-172.
- Zimmermann M, Seifert V: Endothelin and subarachnoid hemorrhage: An overview. *Neurosurgery* 1998;43:863-875; discussion 875-866.
- Zmijewski JW, Bae HB, Deshane JS, Peterson CB, Chaplin DD, Abraham E: Inhibition of neutrophil apoptosis by pai-1. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;301:L247-254.
- Zwissler B, Kemming G, Habler O, Kleen M, Merkel M, Haller M, Briegel J, Welte M, Peter K: Inhaled prostacyclin (pgi2) versus inhaled nitric oxide in adult respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996;154:1671-1677.



